

„Substituierte Oligo(ethylenglykol)-derivate zur Oberflächenmodifizierung“

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt

der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften

der Technischen Universität Dresden

von

Dipl.-Chem. Mandy Gnauck

geboren am 08. August 1975 in Bautzen

Gutachter: Prof. Dr. Hans-Jürgen P. Adler
Prof. Dr. Karl-Friedrich Arndt
Prof. Dr. Marcus Textor

Eingereicht am: 14. November 2008

Tag der Verteidigung: 07. Juli 2009

*„Nyott stropstnopirni hapfel zach,
hapfel zach stropstnopirni!“*

**„Nicht für das Lernen leben wir,
wir lernen für das Leben!“**

urschrecksisch;
aus dem Dialog zwischen Schreckse und Echo;
aus: „Der Schreckenmeister“ von Walter Moers

DANKSAGUNG

Am Ende einer Doktorarbeit kommt ein Zeitpunkt, an dem man über all die Personen und Ereignisse nachdenkt, die zum Gelingen dieser Arbeit und damit zu diesem bedeutenden Schritt in meinem Leben beigetragen haben.

Der ersten Person, der ich danken möchte, ist Prof. Dr. rer. nat. habil. Hans-Jürgen P. Adler. Sehr geehrter Herr Prof. Adler, ich danke Ihnen, dass Sie mir die Möglichkeit gegeben haben, an Ihrem Institut zu promovieren und für Ihre volle Unterstützung, die Sie mir während der Anfertigung dieser Arbeit zu kommen ließen.

Frau Dr. rer. nat. Evelin Jähne danke ich für die Überlassung dieses sehr interessanten Themas, für die intensive Betreuung, für Anregungen und die Diskussionsbereitschaft sowie für den stetigen Optimismus, wenn die Chemie nicht so wollte, wie sie sollte und außerdem für das gute freundschaftliche Verhältnis über die gesamte Zeit. Vielen Dank, Evi!

Ein besonders großes Dankschön geht an unsere Kooperationspartner an der ETH Zürich. Besonders möchte ich mich bei Prof. Dr. Marcus Textor für die fachlichen Diskussionen sowie für die Möglichkeit bedanken, bei ihm am Institut intensiv zu arbeiten sowie für die großzügige Bereitstellung von Arbeitsmaterialien, vor allem von TiO₂-Substraten. Bei Dr. Thomas Blättler, Dr. Samuele Tosatti und Dr. Stefan Zürcher bedanke ich mich ebenfalls für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die fachliche Unterstützung sowie die Hilfe bei der Durchführung von zahlreichen Messungen.

Ein großer Dank geht an die Crew aus Labor 114/115 im Hempelbau, mit denen ich die letzten vier Jahre zusammengearbeitet habe; Herrn Dipl.-Chem. Marcus Tietze, Herrn Dipl.-Chem. René Luther und Frau Dr. Kinga Haubner. Ich danke euch für die sehr informative, diskussionsreiche und spaßige Zeit und wünsche euch alles Gute und ganz viel Erfolg für eure Zukunft.

Ein spezielles Dankeschön widme ich Frau Dipl.-Chem. Anke Ziegler, Herrn Dipl.-Chem. Thomas Junghans sowie meinen zwei Chemielaboranten, Mirko Richter und Sophie Brumme, ohne deren Unterstützung so viele Ergebnisse in dieser Zeit nicht möglich gewesen wären.

Allen Kollegen und Freunden der Arbeitskreise von Prof. Adler und Prof. Arndt danke ich für die freundschaftliche und angenehme Atmosphäre.

Für die Durchführung von diversen Messungen bedanke ich mich bei:

Frau I. Poitz und Frau M. Dziewiencki (MTC) – DSC-, TGA- und IR-Messungen

Frau A. Rudolph und Frau Dr. M. Gruner (OCI)– NMR-Messungen

Frau A. Peritz (OCI) – Elementaranalyse

Frau Dr. Berger (IHM) und Herrn Dipl.-Chem. C. Schrage (ACI) – AFM-Messungen

Herrn Dr. K.-J. Eichhorn und Herrn R. Schulze (IPF) – Ellipsometrie-Messungen

Frau Dr. Senta Reichelt (IPF) – in-situ-Ellipsometrie-Messungen

Frau Dr. B. Adolphi (IHM) – XPS-Messungen

Herrn Dipl.-Chem. M. Kirsten (POC) - Molekülberechnungen

Diese Arbeit wurde mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft DFG im Rahmen des EUROCORE SONS-PROJEKTES „NANO SMAP“ ermöglicht, wofür ich mich herzlich bedanke.

Meinen lieben Freunden Alex, Christian, Daniel, Katha, Nadine, Bine und Simi widme ich ein ganz großes Dankeschön für die superschöne Zeit.

Besonders und von ganzem Herzen danke ich meinen lieben Eltern, meiner Familie und meinem Freund Oliver, die mir in meinem Leben immer eine große Unterstützung waren und immer sein werden.

INHALT

1.	EINLEITUNG	1
1.1	Problemstellung	1
1.2	Zielstellung	1
1.3	Aufgabenstellung	3
2.	METALLOXIDOBERFLÄCHEN – EIGENSCHAFTEN UND MODIFIKATIONEN	5
2.1	Die Titandioxidoberfläche	5
2.2	Die Aluminiumoxidoberfläche	8
2.3	Modifikation durch Grenzflächenchemie	11
2.4	Oberflächenmodifikation durch organische Phosphorverbindungen	15
	2.4.1 Selektive Oberflächenmodifikation	17
2.5	Poly(ethylenglykol) und Oligo(ethylenglykol): Eine Alternative zur Kontrolle der unspezifischen Proteinadsorption	18
2.6	Oberflächen in Kontakt mit dem biologischen System	20
	2.6.1 Proteinadsorption	21
3.	SYNTHESE UND CHARAKTERISIERUNG NEUER SELF-ASSEMBLY-FÄHIGER MOLEKÜLE	25
3.1	Strukturkonzept – Ziel und Strategie	25
3.2	Grundlagen zur Darstellung funktionalisierter OEG-terminierter Monoalkylphosphorsäure- und Alkylphosphonsäurederivate	30
	3.2.1 Reaktionsmechanismus der Grignard-Reaktion mit anschließender Kupplungsreaktion	30
	3.2.2 Reaktionsmechanismus der Williamson'schen Ethersynthese	31
	3.2.3 Reaktionsmechanismus der Hydroborierung	32
	3.2.4 Reaktionsmechanismus der Phosphorylierung	32
	3.2.5 Reaktionsmechanismus der Finkelstein-Reaktion	33
	3.2.6 Reaktionsmechanismus der Michaelis-Arbuzov-Reaktion	34

3.2.7	Reaktionsmechanismus der Mitsunobu-Reaktion	35
3.3	Material und Charakterisierungsmethoden	36
3.3.1	Chemikalienverzeichnis	36
3.3.2	Charakterisierungsmethoden	38
3.4	Synthese von carboxylterminierten Tri(ethylenglykol)-monoalkylphosphorsäuren	39
3.4.1	Erste Synthesestufe: Grignard- mit anschließender Kupplungsreaktion	41
3.4.2	Zweite Synthesestufe: Williamson'sche Ethersynthese	43
3.4.3	Dritte Synthesestufe: Williamson'sche Ethersynthese	45
3.4.4	Vierte Synthesestufe: Hydroborierung	47
3.4.5	Fünfte Synthesestufe: Phosphorylierung	49
3.4.6	Sechste Synthesestufe: Entschützungsreaktion	52
3.5	Synthese von carboxylterminierten Tri(ethylenglykol)-alkylphosphonsäuren	54
3.5.1	Fünfte Synthesestufe: Finkelstein-Reaktion	56
3.5.2	Sechste Synthesestufe: Michaelis-Arbuzov-Reaktion	58
3.5.3	Siebente Synthesestufe: Entschützungsreaktion	61
3.6	Synthese von aminoterminalisierten Tri(ethylenglykol)-alkylphosphonsäuren	63
3.6.1	Dritte Synthesestufe: Mitsunobu-Reaktion	65
3.6.2	Vierte Synthesestufe: Hydroborierung	67
3.6.3	Fünfte Synthesestufe: Finkelstein-Reaktion	70
3.6.4	Sechste Synthesestufe: Michaelis-Arbuzov-Reaktion	72
3.6.5	Siebente Synthesestufe: Entschützungsreaktion	74
3.7	Synthese der carboxylterminierten Alkylphosphonsäure	78
3.7.1	Zweite Synthesestufe: Hydroborierung	79
3.7.2	Dritte Synthesestufe: Williamson'sche Ethersynthese	80
3.7.3	Vierte Synthesestufe: Michaelis-Arbuzov-Reaktion	81
3.8	Oberflächenreaktionen	83
3.8.1	Spezifische Anbindung von Poly-L-Lysin an COOH-EG ₃ -C ₁₇ -PO ₃ H ₂	84

3.8.2	Spezifische Anbindung von Streptavidin an NH ₂ -EG ₃ -C ₁₇ -PO ₃ H ₂	85
3.8.3	Anbindung von Hexa(ethylenglykol) und hochverzweigtem Polyglycidol an eine COOH-C ₁₇ -PO ₃ H ₂ Monoschicht über Oberflächenreaktionen	86
3.8.3.1	Anbindung von Hexa(ethylenglykol)	87
3.8.3.2	Anbindung von hochverzweigtem Polyglycidol	88
4.	OBERFLÄCHENMODIFIKATION: MATERIALIEN, PROTOKOLLE, CHARAKTERISIERUNGSMETHODEN	90
4.1	Substrate	90
4.1.1	Aluminiumoxidsubstrate	90
4.1.2	Titandioxidsubstrate	91
4.1.3	Strukturierte Oberflächen	92
4.2	Lösungsmittel, Chemikalien, Puffer	94
4.2.1	Lösungsmittel, Chemikalien	94
4.2.2	SA-Moleküle	95
4.2.3	Puffer	96
4.2.4	Proteine	97
4.3	Protokolle zur Oberflächenmodifikation	102
4.3.1	Protokolle zur Glas- und Substratreinigung	102
4.3.1.1	Glasreinigung	102
4.3.1.2	Substratreinigung	103
4.3.2	Protokoll zur Adsorption von Monoalkylphosphorsäure- und Alkylphosphonsäurederivaten	104
4.3.3	Protokoll zur Durchführung von Proteinadsorptionstests	105
4.4	Protokolle zur Oberflächencharakterisierung	109
4.4.1	Kontaktwinkelmessungen	109
4.4.1.1	Methode und Messprinzip	109
4.4.1.2	Anwendung auf Monoschichten	115
4.4.1.3	Protokoll zur Kontaktwinkelmessung	115
4.4.2	Mikrotropfenanalyse	115

4.4.2.1 Methode und Messprinzip	115
4.4.2.2. Protokoll zur Mikrotropfenanalyse	116
4.4.3 Atom-Kraft-Mikroskopie	117
4.4.3.1 Methode und Messprinzip	117
4.4.3.2. Protokoll zur AFM-Messung	119
4.4.4 Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR-Spektroskopie)	119
4.4.4.1 Methode und Messprinzip	119
4.4.4.2 Anwendungen der SPR-Spektroskopie auf Monoschichten	122
4.4.4.3 Protokoll zur Durchführung von SPR-spektroskopischen Untersuchungen	123
4.4.5 Spektroskopische Ellipsometrie	127
4.4.5.1 Methode und Messprinzip	127
4.4.5.2 Anwendungen der Ellipsometrie auf Monoschichten	129
4.4.5.3 Protokoll zur Ellipsometriemessung	129
4.4.6 Röntgen-Photoelektronen-Spektroskopie (XPS oder ESCA)	132
4.4.6.1 Methode und Messprinzip	132
4.4.6.2 Anwendung der XPS auf Monoschichten	134
4.4.6.3 Protokoll zur XPS-Messung	135
5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION	136
5.1 Synthese	136
5.1.1 Darstellung der Verbindungen COOH-EG ₃ -C ₁₁ -PO ₄ H ₂ und COOH-EG ₃ -C ₁₇ -PO ₄ H ₂	136
5.1.2 Darstellung der Verbindungen COOH-EG ₃ -C ₁₁ -PO ₃ H ₂ und COOH-EG ₃ -C ₁₇ -PO ₃ H ₂	139
5.1.3 Darstellung der Verbindungen NH ₂ -EG ₃ -C ₁₁ -PO ₃ H ₂ und NH ₂ -EG ₃ -C ₁₇ -PO ₃ H ₂	140
5.1.4 Darstellung der Verbindung COOH-C ₁₇ -PO ₃ H ₂	142
5.2 Oberflächencharakterisierung	142
5.3 Self-Assembly-Monoschichten (SAMs)	144

5.3.1	Adsorption der Monoalkylphosphorsäure- und Alkylphosphonsäurederivate	145
5.3.1.1	Bestimmung der Kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC)	145
5.3.1.2	Ergebnisse der Kontaktwinkelmessung	146
5.3.1.3	Ergebnisse der Mikrotropfenanalyse	152
5.3.1.4	Ergebnisse der Spektroskopischen Ellipsometrie	155
5.3.1.5	Ergebnisse der SPR-Spektroskopie und der in-situ-Ellipsometrie	162
5.3.1.6	Ergebnisse der XPS-Untersuchung	165
5.3.2	Selektive Anbindung auf strukturierten Oberflächen	174
5.4	Stabilität der Monoschichten	175
5.4.1	Ergebnisse der Ellipsometrie	176
5.4.2	Ergebnisse der XPS-Untersuchung	180
5.4.3	Ergebnisse der SPR-Spektroskopie	181
5.5	Proteinadsorptionsuntersuchungen	185
5.5.1	Unspezifische Proteinadsorption	185
5.5.1.1	Ergebnisse der ex-situ-Ellipsometrie	185
5.5.1.2	Ergebnisse der in-situ-Ellipsometrie	188
5.5.1.3	Ergebnisse der SPR-Spektroskopie	190
5.5.1.4	Ergebnisse der Oberflächenreaktionen	194
5.5.2	Spezifische Proteinadsorption	199
6.	ZUSAMMENFASSUNG	204
7.	AUSBLICK	208
8.	LITERATURVERZEICHNIS	210

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AFM	Atom-Kraft-Mikroskopie
Al ₂ O ₃	Aluminiumoxid
9-BBN	9-Borabicyclo-[3.3.1]-nonan
BSA	Rinderserumalbumin
CH ₂ Cl ₂	Dichlormethan
DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
DEAD	Diethylazodicarboxylat
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DMF	Dimethylformamid
DSC	Differential Scanning Calorimetry
FHS	Vollständiges Menschliches Serum
FTIR	Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie
HCl	Salzsäure
HEG	Hexa(ethylenglykol)
HEPES2	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfonsäure
HPG	hochverzweigtes Polyglycidol
IEP	Isoelektrischer Punkt
IR	Infrarot-Spektroskopie
LaSFN9	spezielles, hochbrechendes Glas; n=1,8455
MTA	Mikrotropfenanalyse
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NMR	Kernresonanzspektroskopie
n	Brechungsindex
OEG	Oligo(ethylenglykol)
OPA	Octadecylphosphonsäure
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PEG	Poly(ethylenglykol)
PM-IRRAS	„polarization modulated – infrared reflection absorption spectroscopy“
PPh ₃	Triphenylphosphin
RT	Raumtemperatur

SA	self-assembly
SAM	Self-Assembly-Monoschicht
SiO ₂	Siliziumdioxid
SPR-Spektroskopie	Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie
TEA	Triethylamin
THF	Tetrahydrofuran
TiO ₂	Titandioxid
TosCl	Toluol-4-sulfonylchlorid
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
XPS	Röntgen-Photoelektronen-Spektroskopie

1. Einleitung

1.1 Problemstellung

Die unspezifische Wechselwirkung von Proteinen mit künstlichen Oberflächen spielt in vielen medizinischen, biochemischen und biotechnologischen Anwendungen eine zentrale Rolle. Bei unspezifischen Anbindungen von Proteinen an Oberflächen handelt es sich um unerwünschte, uncharakteristische und undefinierte Wechselwirkungen mit einer Vielzahl von Bindungsmöglichkeiten. Der Adsorptionsprozess von Proteinen ist im Allgemeinen sehr kompliziert und kann durch Heterogenitäten in der Oberfläche, durch die Anwesenheit und Konformation anderer Proteine, durch Van-der-Waals- und Coulomb-Wechselwirkungen, durch den hydrophoben Effekt sowie durch das Redox/Korrosionspotential beeinflusst werden. Unspezifische Proteinadsorptionsprozesse stellen eine wesentliche Fehlerquelle in der biomedizinischen Analytik dar. Die Kenntnis über Art, Menge und Konformation unspezifisch angebundener Proteine ist darüber hinaus eine wichtige Voraussetzung für die Herstellung biokompatibler Materialien, wie sie zum Beispiel für Prothesen, Implantate, Katheter oder Kontaktlinsen benötigt werden. Besonders interessant sind in diesem Zusammenhang Oberflächenbeschichtungen, die unspezifische Proteinanlagerungen unterbinden und dadurch die Körperverschbarkeit des Materials deutlich verbessern.

1.2 Zielstellung

Die Immobilisierung von Oligo- oder Poly(ethylenglykol) an Oberflächen von Metallen ist ein viel genutzter Ansatz, um unspezifische Adsorptionen von Biomolekülen, wie Bakterien, Zellen und Proteinen zu minimieren bzw. zu verhindern [1 – 7]. Wie durch eine Vielzahl von Forschungsarbeiten belegt wurde, zeigen vor allem Poly- und Oligo(ethylenglykol)-terminierte Alkanthiole immobilisiert auf Goldoberflächen herausragende, proteinresistente

Eigenschaften [8 – 12]. Da aber im biochemischen als auch medizinischen Bereich häufig metalloxidische Materialien, wie Titandioxid verwendet werden, ist es notwendig, Oligo(ethylenglykol)-terminierte Beschichtungen für diese Oberflächen zu entwickeln.

Das Projekt EUROCORE SONS PROGRAMM „NANO SMAP“ befasste sich mit dem Design neuer biokompatibler Oberflächen, die eine unspezifische Adsorption von Proteinen minimieren, aber die spezifische Anbindung biofunktionaler Spezies ermöglichen. Im Rahmen des Projektes sollten neuartige und robuste Oberflächen entwickelt werden, die für spätere biochemische und medizinische Forschungszwecke eine Strukturierung aufweisen und die Oberfläche in biologisch wechselwirkende und nicht wechselwirkende (proteinresistente) Flächen unterteilt. Eine Oberfläche, die zum Beispiel in TiO_2 und SiO_2 Bereiche gegliedert ist, sollte mit Hilfe einer neu entwickelten Technik, dem sogenannten „selective molecular assembly patterning“ (SMAP) strukturiert werden. D.h. durch die selektive Anbindung spezieller SA-fähiger Moleküle auf TiO_2 oder SiO_2 sollten Flächen mit unterschiedlichen Oberflächeneigenschaften erzeugt werden. Dazu ist es erforderlich, dass die Verbindungen eine oberflächenspezifische Affinität aufweisen und durch eine zusätzliche terminale Funktionalisierung eine Biokompatibilität sowie eine spezifische Biofunktionalität herstellen.

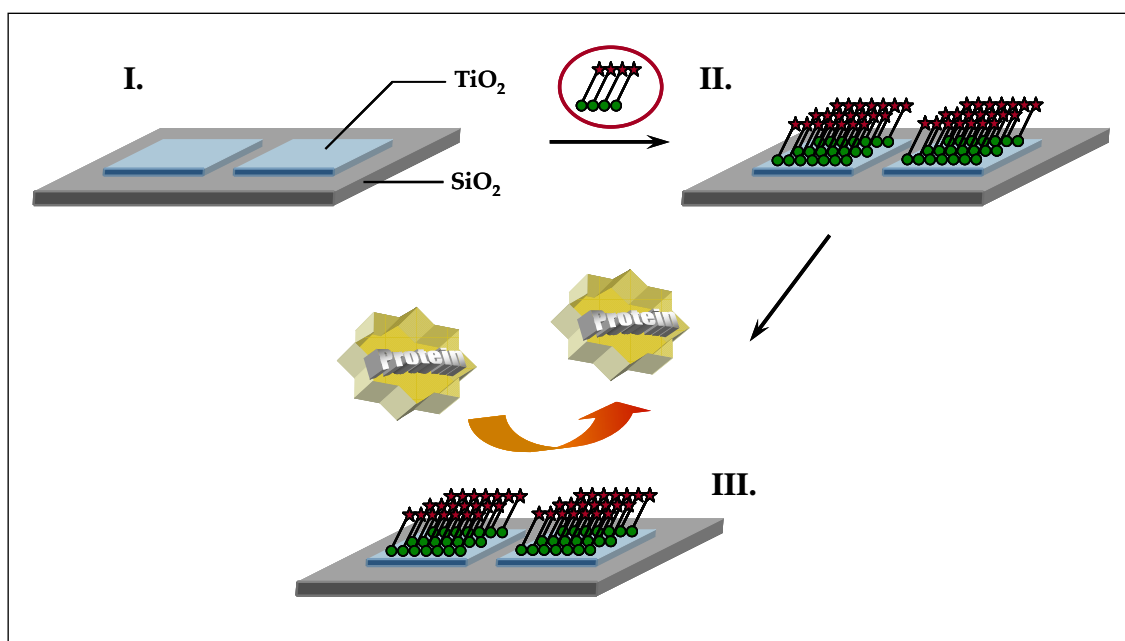


Abbildung 1-1: Schematische Darstellung der SMAP-Technik (I. und II.) sowie der daraus resultierenden proteinresistenten Eigenschaft der Oberfläche (III.)

Seit vielen Jahren werden SA-fähige Moleküle auf der Basis von organischen Alkylphosphonsäure- und Monoalkylphosphorsäurederivaten synthetisiert und appliziert.

Durch ihre Fähigkeit zur Selbstorganisation aus wässriger Lösung bilden diese Verbindungen auf metalloxidischen Oberflächen stabile Monoschichten aus. Der sogenannte SA-Prozess stellt dabei eine interessante und kostengünstige Technik dar, die in einem weiten Feld der Oberflächenmodifizierung Anwendung findet, z.B. als Korrosionsinhibitor oder als Beschichtung für Sensoren [13 - 15]. Aufgrund der bestehenden Erfahrungen in der Modifizierung von Aluminiumoxidoberflächen hinsichtlich des Korrosionsschutzes [13, 14], übernahm der Arbeitskreis die Synthesearbeiten für das „NANO SMAP“-Projekt. Bei der Applikation der dargestellten Verbindungen diente Al_2O_3 ausschließlich als Modelloberfläche, die daraus resultierenden Erfahrungen werden auf TiO_2 übertragen. Das Ziel dieser Arbeit besteht in der Entwicklung, Darstellung, Charakterisierung und Applikation SA-fähiger Moleküle, die gezielt auf TiO_2 und nicht auf SiO_2 -Oberflächen anbinden können. Die resultierenden Monoschichten sollten eine Biokompatibilität sowie Biofunktionalität aufweisen.

1.3 Aufgabenstellung

Die Aufgabe dieser Dissertation kann in vier Teile untergliedert werden: (1.) Synthese und Charakterisierung der neuen Verbindungen; (2.) Adsorption und Charakterisierung der Monoschicht auf metalloxidischen Oberflächen; (3.) Stabilitätsverhalten der adsorbierten Spezies gegenüber Puffersystemen; (4.) Verhalten der Monoschichten gegenüber unspezifischer und spezifischer Proteinadsorption.

Die Hauptaufgabe besteht in dem Design und der Darstellung maßgeschneiderter, definierter Moleküle [16], auf der Basis funktionalisierter Oligo(ethylenglykol)-terminierter Monoalkylphosphorsäure- und Alkylphosphonsäurederivate, die auf planaren, reaktiven metalloxidischen Oberflächen stabile Self-Assembly-Monoschichten (SAMs) ausbilden. Die entwickelten Moleküle sind generell in vier unterschiedliche funktionelle Teile untergliedert: die Phosphorsäure- bzw. Phosphonsäuregruppe als oberflächenaktive Kopfgruppe zur kovalenten Anbindung der Moleküle an Titandioxidoberflächen; den Alkylspacer, der aufgrund der Van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen den hydrophoben Alkylketten die Ordnung der Moleküle bewirkt; die Oligo(ethylenglykol)-einheit, zur Resistenz gegenüber unspezifischer Proteinadsorption; und die terminale funktionelle Gruppe, welche

als Linker zur Anbindung spezifischer Bioliganden fungiert. Bei diesen Molekülen handelt es sich um neue, bisher in der Literatur noch nicht beschriebene Verbindungen.

Um proteinresistente Schichten zu erzeugen, ist die Ausbildung von dicht gepackten, gut geordneten Monoschichten wichtig. Durch eine Variation der oberflächenaktiven Haftgruppe, der Alkylspacerlänge, der terminalen funktionellen Gruppe sowie der Oligo(ethylenglykol)-einheit kann eine Optimierung der Schichteigenschaften erzielt werden. Zur Darstellung proteinresistenter Oberflächen werden zwei mögliche Wege verfolgt; zum Einen die direkte Substitution des Tri(ethylenglykols) an die jeweiligen Verbindungen und zum Anderen die Einführung von Hexa(ethylenglykol) sowie Polyglycidol über Oberflächenreaktionen an eine reaktive, dicht gepackte Monoschicht einer carboxylterminierten Alkylphosphonsäure. Die Untersuchung des Adsorptionsvermögens dieser Verbindungen auf TiO_2 -Substraten erfolgt anhand analytischer Methoden, wie Kontaktwinkelmessungen, Mikrotropfenanalyse (MTA), Atom-Kraft-Mikroskopie (AFM), Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR-Spektroskopie), Spektroskopische Ellipsometrie und der Röntgen-Photoelektronen-Spektroskopie (XPS).

Eine Voraussetzung zur Durchführung von Proteinadsorptionsuntersuchungen an modifizierten Oberflächen ist die Stabilität der adsorbierten Monoschicht auf metalloxidischen Oberflächen in Gegenwart von Pufferlösungen. Aus diesem Grund werden auf Titandioxid- und Aluminiumoxidsubstraten immobilisierte Alkylphosphon- und Monoalkylphosphorsäurederivate mit verschiedenen Puffersystemen auf ihre Stabilität getestet. Anschließend werden unspezifische und spezifische Adsorptionsversuche mit unterschiedlichen Proteinen an modifizierten metalloxidischen Oberflächen durchgeführt, die sowohl proteinresistente als auch biofunktionale Eigenschaften aufweisen. Um die Stabilität der Monoschichten, die Menge an Proteinen sowie den kinetischen Verlauf einer Proteinadsorption an einer Oberfläche zu untersuchen, werden analytische Methoden, wie die SPR-Spektroskopie, XPS und die Spektroskopische Ellipsometrie verwendet.

Aufgrund der dargestellten Vorgehensweise stehen am Ende der Arbeit eine Reihe von gut charakterisierten, maßgeschneiderten Molekülen zur Verfügung, die immobilisiert auf metalloxidischen Oberflächen ein resistentes Verhalten gegenüber unspezifischer Proteinadsorption aufweisen sowie eine spezifische Anbindung biofunktionaler Moleküle ermöglichen.

2. Metalloxidoberflächen- Eigenschaften und Modifikationen

2.1 Die Titandioxidoberfläche

Titan gehört zu den Elementen, das in der Reihe der Häufigkeit an zehnter Stelle, nach Magnesium und Wasserstoff steht. In der Natur kommt Titan nur in kleinen Konzentrationen und nur in gebundener Form als oxidische Verbindung vor. Besonders weit verbreitet ist es in eisenhaltigen Erzen, wie Ilmenit. Die charakteristischen Eigenschaften von Titan korrosionsbeständig gegenüber Atmosphärien (Luft, Wasser) sowie chemisch inert zu sein, basieren auf der spontanen Ausbildung einer äußerst dünnen, zusammenhängenden Oxidschicht (3-7 nm) [17, 18] auf der Metalloberfläche, die passivierend wirkt. Diese Oxidschichten lassen sich durch Oxidation sowie durch eine gezielte Einstellung der Parameter, wie Temperatur und Sauerstoffgehalt, kontrolliert herstellen. Titanimplantate mit einer definierten Oxidschicht werden im medizinisch-technischen Bereich wegen ihrer hervorragenden Biokompatibilität und mechanischen Eigenschaften schon lange mit großem Erfolg verwendet, z. B. als Gefäßstütze (Stents), als Knie- und Schultergelenk oder als Nagel bzw. Schraube zur Fixierung in der Chirurgie. [18]

Die bakterizide Wirkung von Titandioxidoberflächen beruht auf dem photokatalytischen Effekt. Bedingt durch die elektronische Struktur können Elektronen durch UV-Licht angeregt werden, was in Gegenwart von Sauerstoff und Wasser zur Ausbildung von hochreaktiven Radikalen (z.B. dem Hydroxylradikal und dem Perhydroxylradikal) führt. Diese Radikale wirken toxisch auf Mikroorganismen, wie Bakterien, Hefen oder Pilze und auf Chemikalien sowie Umweltgifte oxidativ zersetzend. Aufgrund dieser Eigenschaft findet Titandioxid auch als Photokatalysator auf selbstreinigenden Oberflächen sowie in der Wasser- und Luftreinigung Anwendung [19].

Titan ist in der Natur besonders verbreitet als Ilmenit (FeTiO_3), Titanit ($\text{CaTiO}[\text{SiO}_4]$), Perowskit (CaTiO_3) sowie Titandioxid (TiO_2). Das letztere Mineral existiert in drei verschiedenen Modifikationen: dem am häufigsten vorkommenden tetragonalen Rutil, dem selteneren tetragonalen Anatas und dem rhombischen Brookit. Alle drei Modifikationen sind aus TiO_6 -Oktaedern aufgebaut, die gemeinsame Kanten besitzen, aber unterschiedlich miteinander verknüpft sind. Die dünne natürliche Oxidschicht, die sich bei Raumtemperatur auf Titanoberflächen ausbildet, ist amorph. Bei höheren Temperaturen entstehen zwei kristalline Modifikationen Rutil und Anatas. In beiden Fällen sind die Titankationen durch sechs Sauerstoffanionen koordiniert [17].

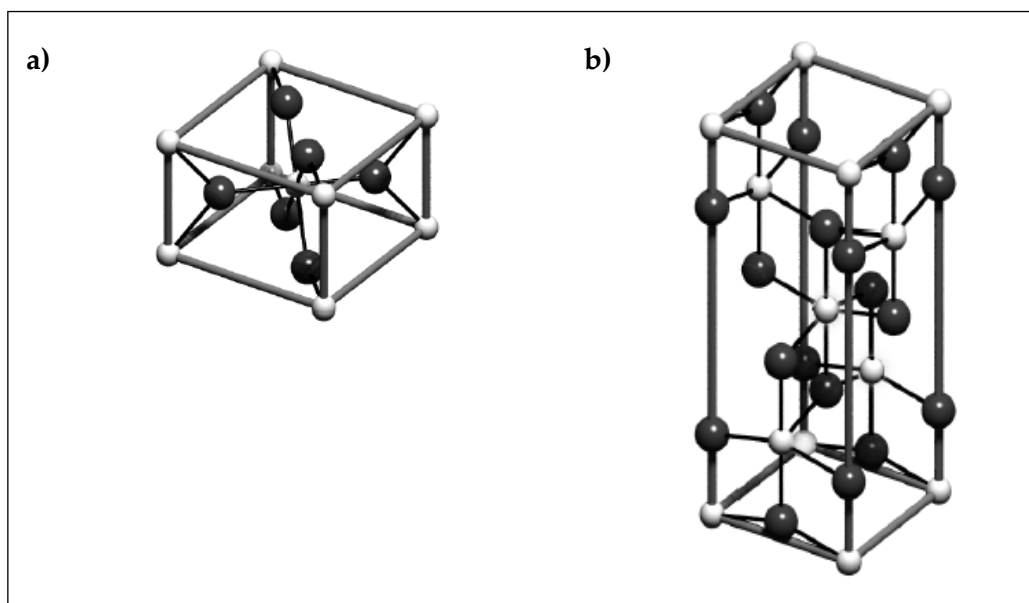


Abbildung 2-1: Kristallstrukturen von zwei Modifikationen des TiO_2 , a) Rutil, b) Anatas (weiß: Titankationen, schwarz: Sauerstoffanionen)

Bei einer Exposition mit sauerstoffhaltigen Verbindungen reagiert das Metall Titan aufgrund seiner thermodynamischen Instabilität sofort zum jeweiligen Oxid. In seinen Verbindungen kann Titan verschiedene Oxidationszahlen annehmen; die dabei am häufigsten auftretende Oxidationsstufe ist +IV, wie sie z. B. in TiO_2 vorkommt. Diese Spezies ist vom thermodynamischen Standpunkt aus sehr stabil, weil die freie Enthalpie zur Bildung des Oxids einen negativen Wert ($\Delta H = -888,8 \text{ kJ/mol}$ pro mol Oxid) für eine Vielzahl von Oxidationsmedien, wie z. B. Sauerstoff, Wasser und sauerstoffhaltige Organika, annimmt [18].

Die Eigenschaften einer gewachsenen Oxidschicht sind sehr wichtig hinsichtlich definierter Aussagen über die Oberflächenbeschaffenheit und die Effektivität für weitere

Modifikationsschritte, wie zum Beispiel Adsorption von Molekülen oder andere Arten der Oberflächenfunktionalisierung.

Tabelle 2-1: Ausgewählte physikalisch-chemische Eigenschaften von TiO₂ und anderen Metalloxiden

Element	Stabiles Oxid	Isoelektrische Punkt	Oberflächenladung bei pH7	Dielektrische Konstante des Oxids	Löslichkeit bei pH7 [mol/l]	Typische Reaktionen von Zellen und Gewebe
Ti	TiO ₂	3,5 – 6,7	negativ	86 - 170	3·10 ⁻⁶	inert
Al	Al ₂ O ₃	8,8 – 9,5	positiv	9,3 – 11,5	10 ⁻⁶	Anbindung
Ta	Ta ₂ O ₃	2,7 – 3,0	negativ	24 - 65	10 ⁻⁵	inert
Cr	Cr ₂ O ₃	6,7 – 7,4	±0	11,9 – 13,3	10 ⁻¹¹	toxisch

Die Wechselwirkungen zwischen Titandioxidoberflächen und einem biologischen Medium spielen eine große Rolle beim Verständnis der Biokompatibilität des Metalls. In Gegenwart von Wasser entstehen an der Oberfläche des TiO₂ Hydroxygruppen, die als Amphotere wirken, d.h. sie besitzen sowohl basische als auch saure Eigenschaften. Nach *McCafferty* besitzt Titan mit 10 Hydroxygruppen pro nm² die zweithöchste Dichte an reaktiven Gruppen auf der Oberfläche, hinsichtlich der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Metalle [20]. Die Konzentration der Hydroxygruppen an der Oberfläche sowie der basische Charakter des Metalloxides ermöglichen die chemische Anbindung von Molekülen, wie Alkylphosphorsäure- oder Alkylphosphonsäurederivaten, die saure Eigenschaften aufweisen.

Abhängig vom pH-Wert der Lösung und des Isoelektrischen Punktes (IEP) des Oxides (3,5 - 6,7) entstehen an der Grenzfläche Flüssigkeit/TiO₂ negative oder positive Oberflächenladungen. So konnte bei dem physiologischen pH-Wert 7,4 eine hohe Anzahl an Hydroxygruppen sowie eine geringe negative Ladung der Titandioxidoberfläche beobachtet werden [18]. Beide Parameter sind wichtig für die Beschreibung und das Verständnis der hervorragenden Biokompatibilität von Titan. Je höher die Ladungsdichte ist, desto stärker sind die Wechselwirkungen zwischen Proteinen und der Oberfläche. Bei Implantaten kann das zur Denaturierung der Proteine und somit zum Biofouling im menschlichen Körper

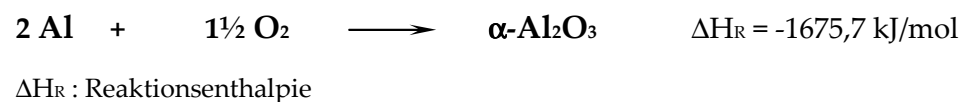
führen. Entzündungen und Abstoßung des Implantates können schließlich die Folge sein. Um diesen Prozessen entgegen wirken zu können, besteht die Notwendigkeit, Titandioxidoberflächen so zu modifizieren, dass sie eine kontrollierte, spezifische Biokompatibilität aufweisen. Haftvermittler auf der Basis von Cellulosephosphat werden bereits auf Implantatoberflächen aufgebracht, um eine bessere Anbindung des Knochenmaterials (Hydroxylapatit) zu erzielen [21].

2.2 Die Aluminiumoxidoberfläche

Aluminium ist das am weitesten verbreitete unter allen Metallen und nach Sauerstoff und Silizium das dritthäufigste aller Elemente. In der Natur kommt es wegen seiner hohen Sauerstoffaffinität nicht gediegen, sondern nur in Form oxidischer Verbindungen vor. Aluminium ist ein silberweißes Leichtmetall der Dichte 2,699 g/cm³ und findet hauptsächlich Verwendung als Konstruktionswerkstoff. Dabei reicht das Spektrum vom elektrischen Leiter, Verpackungs- und Behältermaterial bis hin zum Bauelement in der Luft- und Raumfahrttechnik, im Fahrzeugbau sowie in der Optik und Lichttechnik [17].

Aufgrund seiner Stellung in der Spannungsreihe und der demzufolge hohen Elektronegativität hat Aluminium ein großes Bestreben mit den meisten Nichtmetallen, wie zum Beispiel Chlor, zu reagieren. Es bildet aber auch mit allen Metallen intermetallische Verbindungen und reagiert mit freien oder gebundenen Sauerstoff unter Sauerstoffaufnahme.

Abbildung 2-2: Reaktion von Aluminium mit Sauerstoff [17]



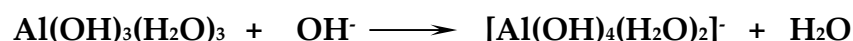
Aluminium reagiert mit Wasser, Säuren und Basen unter Wasserstoffentwicklung zu dreiwertigen Aluminium bzw. zu der Verbindung Al(OH)₃. In neutralem wässrigem Milieu bildet sich Aluminiumhydroxid (Abbildung 2-3), welches die Passivierungsschicht, eine dünne, fest anhaftende Oxidschicht auf der Metalloberfläche, bewirkt.

Abbildung 2-3: Reaktion von Aluminium mit Wasser [2-01]



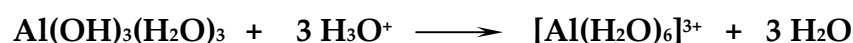
In den nachfolgenden Abbildungen sollen Reaktionen des Aluminiumhydroxids in Gegenwart von Säuren und Basen dargestellt werden. Im basischen Milieu bildet Aluminiumhydroxid das lösliche Aluminat-Anion aus.

Abbildung 2-4: Reaktion von Aluminiumhydroxid im basischen Milieu [2-01]



Im sauren Milieu setzt sich das Aluminiumhydroxid zum löslichen Aluminium-(III)-hexaqua-komplex um.

Abbildung 2-5: Reaktion von Aluminiumhydroxid im sauren Milieu [2-01]



Da Aluminium an seiner Oberfläche eine Passivierungsschicht ausbildet, welche das darunter liegende Metall vor weiterer Oxidation schützt, bleibt es trotz der oben genannten Eigenschaft an Luft beständig. Die natürliche Oxidschicht, welche bei Raumtemperatur in Gegenwart von Sauerstoff oder Luft eine Dicke von 2-4 nm erreicht, genügt aber oftmals nicht, um das Metall vor äußeren Umwelteinflüssen, wie Korrosion, zu schützen. Deshalb besteht durch eine anodische Oxidation (Eloxal-Verfahren) die Möglichkeit, die Schutzwirkung der Passivierungsschicht künstlich zu erhöhen, wodurch eine wesentlich dickere und härtere Schicht erzeugt werden kann [17].

Die Oberfläche des Aluminiums ist aus verschiedenen Hydroxiden und Oxiden aufgebaut. Diese unterscheiden sich in ihrer Kristallstruktur sowie in der Koordination der Oxid- und Hydroxidionen. Die Kristallstruktur kann dabei zwei Modifikationen annehmen, zum einen eine hexagonal dichteste Packung, die α -Modifikation und zum anderen die γ -Modifikation, mit einer kubisch dichtesten Packung. XPS-Untersuchungen haben gezeigt, dass eine native Oxidschicht des Aluminiums aus Aluminiumoxiden, Hydroxiden sowie Oxihydroxiden besteht [2-48]. Oxide enthalten α - Al_2O_3 (Korund) und γ - Al_2O_3 ; Bayerit, Gibbsit und Nordstrandit sind die drei Formen des Hydroxids Al(OH)_3 , während Oxihydroxide aus α -

AlO(OH) (Diaspor) und γ -AlO(OH) (Boehmit) bestehen. Im Gegensatz zu den Oxiden und Oxihydroxiden, die normalerweise im kristallinen Zustand vorliegen, werden diese Verbindungen als dünne Oberflächenschicht auf Aluminium als nicht kristallin angesehen. Es existiert eine kubische Nahordnung innerhalb dieser Schicht.

Aluminiumoxidoberflächen weisen Lewis-Säure-Domänen auf, die drei Arten katalytisch reaktiver Zentren annehmen können. Dabei handelt es sich um dreifach, vierfach oder fünffach koordinierte Aluminiumatome [22].

Der Grund für eine starke Wechselwirkung und schließlich einer erfolgreichen Chemisorption der Phosphor- und Phosphonsäuregruppen auf Aluminiumoxidoberflächen liegt in dem amphoteren Charakter und der Existenz von Hydroxygruppen auf der Oberfläche. Nach *McCafferty und Wightman* [23] besitzt Aluminium mit etwa 15 OH-Gruppen pro nm² die höchste Dichte an reaktiven Gruppen an seiner Oberfläche, hinsichtlich der in dieser Arbeit genutzten Metalloxide. Diese Hydroxygruppen können in unterschiedlicher Koordination an der Oberfläche vorliegen [24]. Dazu wurden verschiedene Modelle entwickelt, zu den Geeigneten zählt das Modell nach *Knözinger*, was in der nachfolgenden Abbildung dargestellt ist [24].

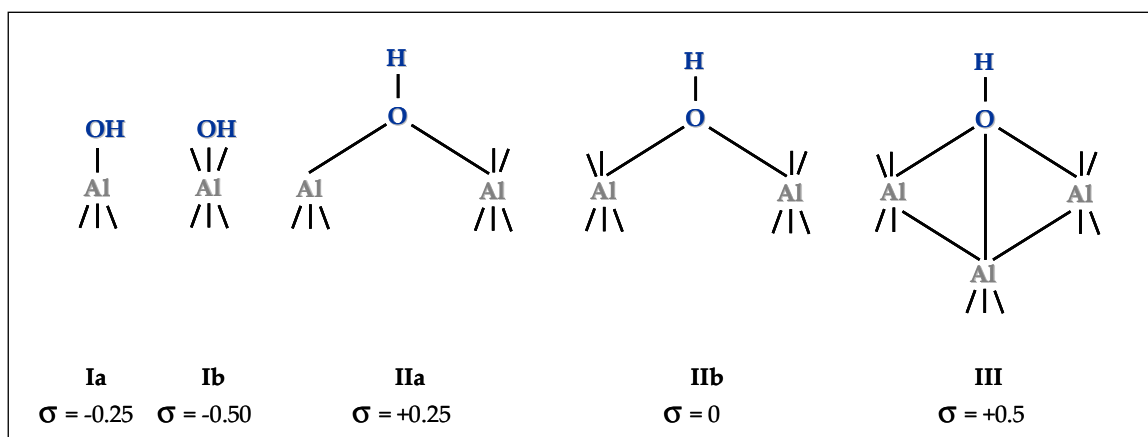


Abbildung 2-6: Darstellung von Hydroxygruppen auf einer Aluminiumoxidoberfläche sowie die resultierende Ladung (σ) an der OH-Gruppe nach *Knözinger* [24]

Dieses Modell lässt sich in der Regel nur auf Aluminiumoxidoberflächen anwenden, die mit einer trockenen Gasphase umgeben sind. Die Hydroxygruppe kann auf der Aluminiumoberfläche terminal (Abbildung 2-6: Ia und Ib), gebrückt (Abbildung 2-6: IIa und IIb) oder tridental (Abbildung 2-6: III) vorliegen. Die daraus resultierende Partiaalladung am Sauerstoff der Hydroxygruppe liegt zwischen -0,5 und +0,5 Elementarladungen.

Umgeben ein anderes Medium die Aluminiumoxidoberfläche, wie zum Beispiel Wasser, werden die Bindungsverhältnisse wesentlich komplexer, da nun Hydroxygruppen in Abhängigkeit vom pH-Wert protoniert bzw. deprotoniert vorliegen können (Abbildung 2-7).

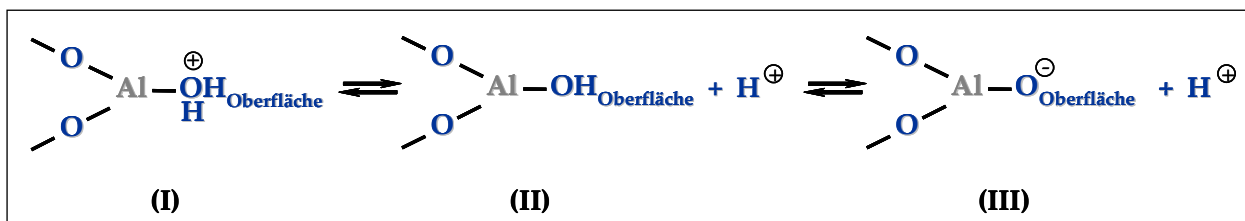


Abbildung 2-7: Darstellung der Veränderung der Oberflächenladung von Aluminiumoxid in Abhängigkeit vom pH-Wert; (I) saures Medium, positive Ladung; (II) Isoelektrischer Punkt; keine Ladung an der Oberfläche (III) basisches Medium, negative Ladung [24]

Die Eigenschaft der Aluminiumoxidoberfläche hängt stark vom pH-Wert ab. In einem sauren Medium, unterhalb dem pH-Wert des IEP, ist die Oberfläche positiv geladen. Der IEP von Al_2O_3 liegt bei einem pH-Wert von 8,8 – 9,5 (siehe Tabelle 2-1). Das bedeutet, dass bei diesem Punkt die Oberflächenladung den Wert Null annimmt. In einem basischen Medium besitzt die Oberfläche eine negative Ladung.

I. Mäge [13] und E. Jähne [14] haben in ihren Arbeiten eine neue umweltfreundliche Methode zum Korrosionsschutz aufgezeigt. Anstelle der Chromatierung wurden self-assembly-fähige Verbindungen, wie Phosphonsäure- und Phosphorsäurederivate zur Ausbildung dünner, stabiler Monoschichten verwendet.

Aufgrund dieser Erfahrungen wurden in der hier vorliegenden Arbeit Aluminiumschichten als Modelloberflächen zu Adsorptionsuntersuchungen von Monoalkylphosphorsäure- und Alkylphosphonsäurederivaten verwendet. Diese Untersuchungen dienten als Grundlage zur Modifizierung von Titandioxidoberflächen.

2.3 Modifikation durch Grenzflächenchemie

Das Konzept der Modifikation von metallischen Oberflächen durch Anwendung der „Grenzflächenchemie“ beinhaltet verschiedene Möglichkeiten zur Erzeugung definierter Grenzflächeneigenschaften für biologische Anwendungen. Ausgehend von einer Vielzahl möglicher Ansätze befasst sich die hier vorliegende Arbeit mit der Darstellung von monomolekularen Schichten auf metallischen bzw. metalloxidischen Oberflächen, um definierte, kontrollierte Oberflächeneigenschaften zu erzielen. Die Bildung dieser

monomolekularen Schichten erfolgt über den Prozess der spontanen Selbstorganisation von oberflächenaktiven organischen Verbindungen an Metall-/Metalloxidoberflächen. Dieses moderne, einfache sowie praktische Verfahren zur Oberflächenmodifizierung wird als Self-Assembly-Prozess bezeichnet. Self-Assembly-Monoschichten (SAMs) sind organische Schichten, die aus der Adsorption von Molekülen aus einer Lösung oder Gasphase auf die planare Oberfläche eines Feststoffs hervorgehen. Moleküle, die sich spontan an der Oberfläche orientieren, sind z.B. Tenside. Neben einer hydrophilen, reaktiven Kopfgruppe benötigen SA-fähige Moleküle eine hydrophobe Alkylkette von mindestens 8 Kohlenstoffeinheiten. Durch diesen sogenannten Spacer bauen sich zwischen den Molekülen Van-der-Waals-Wechselwirkungen auf, die nach *Ulman* [25] neben dem Energiegewinn durch die Adsorptionsreaktion die Triebkräfte zur Ausbildung von SAMs darstellen.

Das Adsorbat organisiert sich spontan auf der Oberfläche und kann in Abhängigkeit von der Molekülstruktur, der Beschaffenheit der Substratoberfläche sowie der resultierenden Packungsdichte der Moleküle, auf der Oberfläche drei unterschiedliche homogene Strukturen [Abbildung 2-8] ausbilden; quasi-kristallin, semikristallin oder amorph [26, 27].

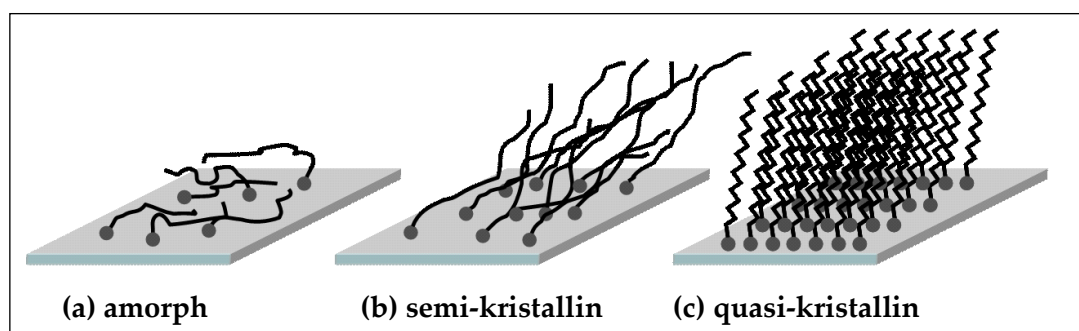


Abbildung 2-8: Darstellung verschiedener homogener Alkyl-Monoschichten auf planaren Oberflächen in Abhängigkeit von der Packungsdichte, (a) ungeordnete Ketten, Orientierung: parallel zur Oberfläche, (b) halbgeordnete Ketten mit kollektivem Neigungswinkel, (c) einheitlich, vertikal orientierte Ketten

Die erste Anwendung der Self-Assembly-Technik (SA-Technik) erfolgte durch *Kuhn* [28], der Trichlorsilane zur Hydrophobierung von Glasoberflächen nutzte. Mitte der achtziger Jahre des vorigen Jahrhunderts zeigten *Allara und Nuzzo* [29], dass selbstorganisierende Monoschichten von Alkanthiolaten auf Gold durch Adsorption von n-Alkandisulfiden aus Lösung gebildet werden. Mit diesem stabilen und einfach zu präparierenden System begann der Erfolg der SA-Technik. Diese Technik entwickelte sich in den letzten dreißig Jahren zu einem leistungsstarken Verfahren, das zur Darstellung ultradünner, hydrophober Filme

durch Adsorption oberflächenaktiver Substanzen auf Metall/Metalloxid-Oberflächen und Glas dient.

Umfangreiche Untersuchungen an verschiedenen Modellsystemen, wie z.B. Alkanthiole auf Gold-, Kupfer- und Silberoberflächen [30, 31], Silane auf hydroxylierten Oberflächen [32, 33] sowie Alkylphosphor- und Alkylphosphonsäurederivate auf metalloxidischen Oberflächen von Aluminium, Titan und Tantal [34, 35] zeigten, dass mit dieser Methode hochgeordnete, gut definierte, monomolekulare Schichten im Nanometer-Bereich gebildet werden können, die physikalische und chemische Eigenschaften an der jeweiligen Grenzfläche signifikant ändern. Zur Darstellung dieser SAMs sind organische Moleküle mit reaktiven Endgruppen erforderlich, die eine hohe Affinität zur Substratoberfläche aufweisen. Damit besteht für diese Verbindungen die Möglichkeit sich selbstständig an der Oberfläche zu orientieren und koordinativ, ionisch oder kovalent anzubinden. Self-Assembly-Schichten (SA-Schichten) besitzen eine typische Schichtdicke von 1-3 nm.

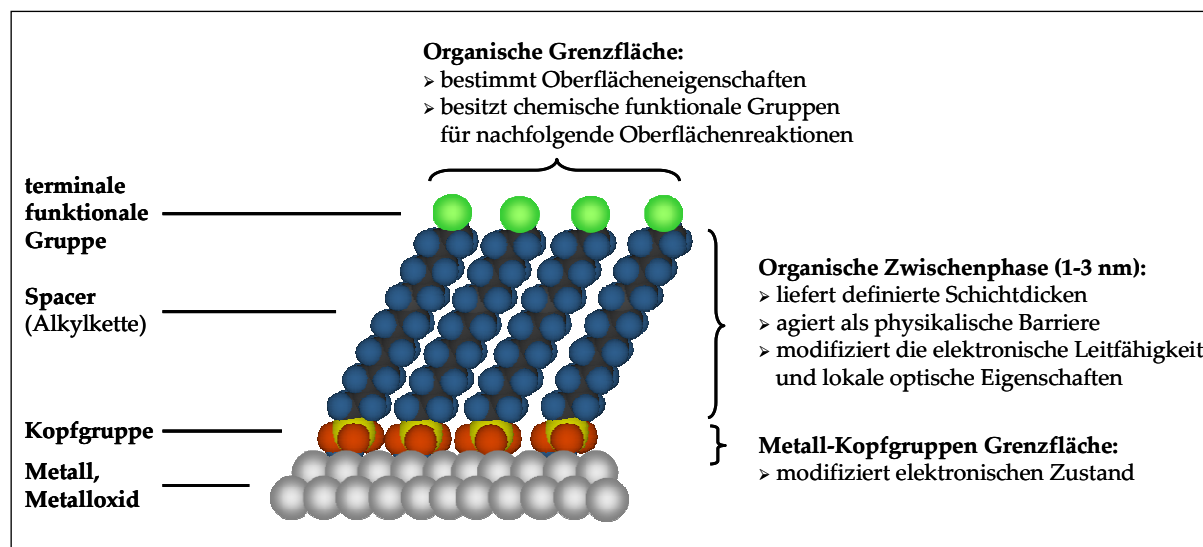


Abbildung 2-9: Schematische Darstellung einer ideal, quasi-kristallinen SA-Schicht von Alkylphosphonsäure- bzw. Alkylphosphorsäurederivaten auf einer metalloxidischen Oberfläche (Al_2O_3 , TiO_2)

Hinsichtlich des breiten Anwendungsspektrums von SAMs, fokussiert sich diese Arbeit auf die Darstellung biokompatibler Oberflächen. Ein sehr gut untersuchtes, exzellentes proteinresistentes Verhalten zeigen dünne Filme von Poly(ethylenglykol) (PEG) [36, 37] sowie Oligo(ethylenglykol) (OEG) [30, 38 - 40], die auf Metalloberflächen immobilisiert wurden. In Tab. 2-2 soll ein Überblick über die am häufigsten untersuchten SA-Systeme gegeben werden, die die oben genannten Bedingungen berücksichtigen.

Tabelle 2-2: Überblick über verschiedene, in biologischen Anwendungen genutzte SA-Systeme

Self-Assembly-Systeme	Substrate	adsorbierte Molekül Spezies	Oberflächeneigenschaften	Analytik	Literatur
Alkylsilane	Glas, SiO ₂ , Metalloxide, Si (111)	$R_3\text{-Si}-(\text{CH}_2)_n\text{-O}-(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_m\text{-CH}_2\text{-X}$ $R=\text{Cl}, \text{OCH}_3, \text{OCH}_2\text{CH}_3$ $X=\text{CH}_3, \text{OH}, \text{COOH}$ PEG, $\text{C}_{18}\text{H}_{37}\text{SiH}_3$	kovalente Immobilisierung von PEG als monomolekulare SA-Schicht, als Bürsten und Knäule, als vernetzte Silane, sehr gute Proteinresistenz, Multischichten	Kontaktwinkel messung, Ellipsometrie, AFM, XPS, FTIR	[33], [36], [37], [41], [42], [43], [44], [45]
Alkanthiole	Gold, Silber, Kupfer, Palladium	$\text{HS}-(\text{CH}_2)_n\text{-O}-(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_m\text{-CH}_2\text{-X}$ $X=\text{OH}, \text{COOH}, \text{CH}_3, \text{NH}_2$, $\text{HS}-(\text{CH}_2)_n\text{-Polyglycidol}$	am meisten untersuchte SA-Systeme, Proteinresistenz bei helicalen Konformation der OEG-Ketten sowie in Abhängigkeit von der OEG-Kettenlänge	siehe Alkylsilane, SPR	[8], [9], [10], [11], [12], [26], [31], [46], [47]
Monoalkylphosphorsäuren, Alkylphosphonsäuren	TiO ₂ , Al ₂ O ₃ , Ta ₂ O ₅ , Glimmer, ZrO ₂	$\text{H}_2\text{O}_3\text{P}-(\text{CH}_2)_n\text{-X}$ $X=\text{COOH}, \text{OH}$ $\text{H}_3\text{O}_4\text{P}-(\text{CH}_2)_n\text{-X}$ $X=\text{CH}_3, \text{OH}$	monomolekulare SA-Schicht Ordnung u. Packungsdichte steigt mit zunehmender Spacerlänge Endgruppenaktivierung zur spezifischen Proteinanbindung	siehe Alkylthiole, ToF-SIMS	[48], [49], [50], [51], [52]
PLL-g-PEG	SiO ₂ , TiO ₂ , Nb ₂ O ₅ , Ta ₂ O ₅	Poly(L-Lysin)-g-poly(ethylenglykol)	Polykation, Ausbildung stabiler, proteinresistenter Schichten auf negativ geladenen Oberflächen durch Chemisorption; SMAP	siehe Alkylphosphonsäure, OWLS	[53], [54], [55], [56], [57], [58]

2.4 Oberflächenmodifikation durch organische Phosphorverbindungen

Organophosphor-Verbindungen wurden in den vergangenen Jahren wegen ihrer Fähigkeit zur Selbstorganisation auf planaren Metalloberflächen vielfältig untersucht. Dabei wurden sie auf natürliche Oxidschichten von Metallen, wie Aluminium, Titan, Eisen, Zink, Kupfer und Messing kovalent angebunden [13, 14, 15, 50, 58, 59, 60]. Organophosphor-Verbindungen bilden attraktive Adsorptionsschichten für zahlreiche Anwendungsgebiete aus, zum Beispiel als Korrosionsinhibitoren [61], zur Phasenseparation (Ultrafiltration) [62, 63], als Katalysatoren [64], in Solarzellen [65], in optischen Geräten [66], in der Mikroelektronik [67], als Biosensoren [57] und an Titanimplantaten [68, 69]. Des Weiteren konnten Organophosphor-Moleküle an Calciumcarbonat- und Calciumphosphat-Oberflächen gebunden werden, um zum Beispiel mechanische Eigenschaften von Polymer-Calciumcarbonat-Kompositmaterialien zu untersuchen [70].

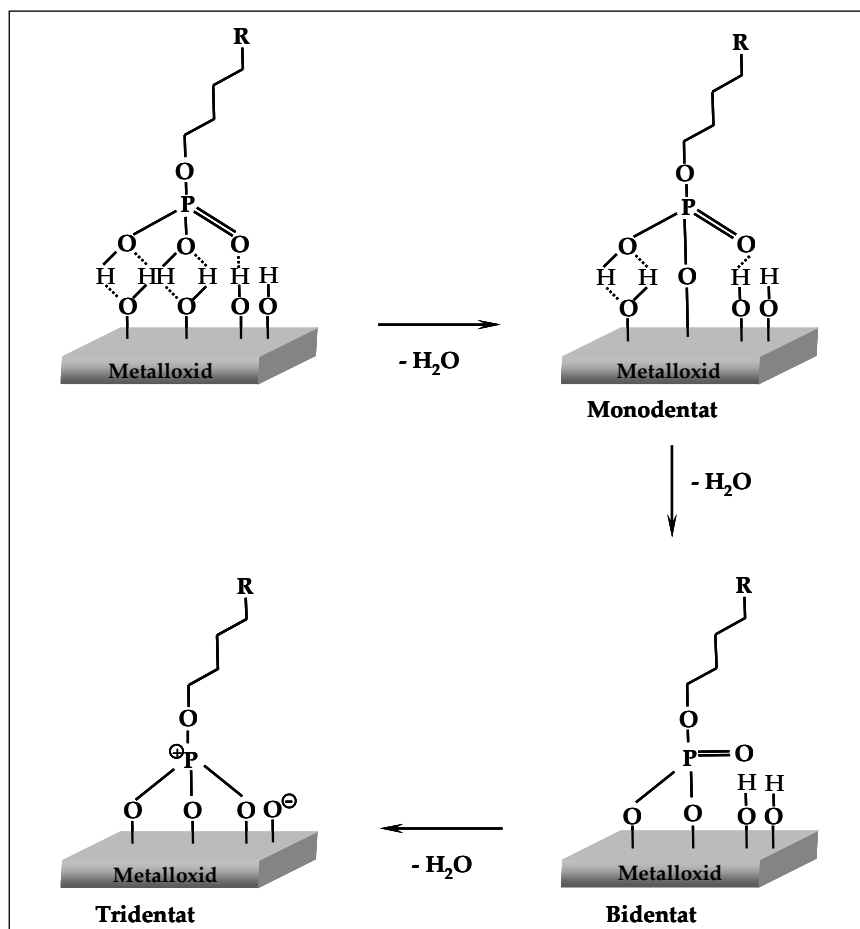
Organische Phosphorderivate bilden eine starke Bindung zur metalloxidischen Oberfläche aus. Die chemische Anbindung (Chemisorption) resultiert aus der thermodynamisch favorisierten Heterokondensation sowie der Koordination der Moleküle an der Oberfläche. Besitzen die Phosphonsäure- und Phosphorsäuremoleküle eine lange Alkylkette (typische Kettenlänge 8 bis 18 C-Atome), führt dies zur Ausbildung von SA-Monoschichten. Der Effekt der Selbstorganisation beruht dabei auf den nicht-bindenden Wechselwirkungen (Van-der-Waals-Wechselwirkungen) zwischen den langen Alkylketten, die eine hohe Packungsdichte und einen hohen Organisationsgrad der Moleküle auf eine metalloxidische Oberfläche induzieren [50, 51, 71, 72]. Unterschiedliche Studien mit Octadecylphosphonsäure (OPA) auf Metalloxiden zeigten die Ausbildung gut geordneter Monoschichten mit einer hohen Packungsdichte von ~3,5-4,4 Molekülen pro nm² [72, 73]. OPA-SAMs auf Zirkoniumdioxid und Titandioxid wiesen eine höhere Hydrolysestabilität in einem pH-Bereich von 1-10 gegenüber SAMs von Organosilizium-Verbindungen [73, 74] auf.

Für die Ausbildung von selbstorganisierenden Schichten sind die in der folgenden Tabelle dargestellten Kräfte verantwortlich.

Tabelle 2-3: Darstellung der treibenden Kräfte bei der Ausbildung von SAMs

pro		contra
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Energie durch Ausbildung (O)-P-O(OH)₂/ Metall – Bindung, ➤ Energie durch Van-der-Waals-Wechselwirkungen 	$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Entropieverlust ➤ thermische Effekte ➤ Verdrängungen

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl Alkylphosphonsäurederivate als auch Monoalkylphosphorsäurederivate dargestellt, die die Eigenschaft besitzen, SAM-Monoschichten auf metalloxidischen Oberflächen auszubilden. In der Abbildung 2-10 soll der Mechanismus der stattfindenden Oberflächenreaktionen exemplarisch für die Adsorption eines Alkylphosphonsäurederivates auf einer natürlichen Oxidoberfläche eines Metalls verdeutlicht werden. Es handelt sich um eine stufenweise Heterokondensationsreaktion, die zwischen der Phosphonsäurekopfgruppe und den Hydroxylgruppen der Metalloxidoberfläche abläuft. Dabei können in Abhängigkeit von der Oberflächengeometrie und der Regioselektivität drei mögliche Adsorbate (Monodentat, Bidentat oder Tridentat) des SA-Moleküls an der Oberfläche gebildet werden.


Abbildung 2-10: Darstellung der Adsorption einer Monoalkylphosphonsäure auf einer metall-oxidischen Oberfläche [75]

Die Nutzung wasserlöslicher Moleküle eröffnet die Möglichkeit, Lösungen mit unterschiedlichen Amphiphilen zu verwenden, um gemischte SA-Monoschichten auf metalloxidischen Oberflächen zu erhalten. Aus diesem Grund wurden wasserlösliche Ammoniumsalze der Monoalkylphosphorsäuren dargestellt, um diese aus wässrigem Medium adsorbieren zu können [71]. Des Weiteren wurden Coadsorptionen von methyl- und hydroxyl-terminierten Dodecylphosphonsäuren durchgeführt, um Mischschichten zu erhalten und eine kontrollierte Hydrophilie der modifizierten Oberflächen zu erzielen [76]. Die Möglichkeit der Adsorption von SA-fähigen Molekülen aus einem wässrigen Medium gestaltet dieses Verfahren attraktiv für biologische in-vitro Untersuchungen sowie potentielle Anwendungen von metalloxidischen Oberflächen als biomedizinische Implantate.

Die generelle hohe Affinität der Phosphorsäure- bzw. Phosphonsäuregruppe zu bestimmten Metalloxiden machte die Einführung einer funktionellen Gruppe an die ω -Position des Moleküls sinnvoll. Die Anwendung von terminal-funktionalisierten Phosphonsäuren als SAMs wurde von *Pawsey et al.* [77] untersucht. Carboxylalkylphosphonsäuren $\text{HO}_2\text{C}-(\text{CH}_2)_n-\text{PO}_3\text{H}_2$ ($n=15$) bildeten SAMs auf Titandioxid und Zirkoniumdioxid durch die selektive Anbindung der Phosphonsäuregruppe an die metalloxidische Oberfläche aus. Die Carboxyl-Funktion blieb dabei als freie funktionelle Gruppe erhalten. Aber nicht nur die chemische Affinität der Phosphorsäure- und Phosphonsäuregruppen zu Metalloxiden, sondern auch die physikalische Größe spielen eine wichtige Rolle für die Ordnung und Struktur der SA-Schicht. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche funktionelle Gruppen gewählt, um die Hydrophilie/Hydrophobie sowie die elektrische Ladung der Oberfläche zu kontrollieren.

2.4.1 Selektive Oberflächenmodifikation

Selektive Oberflächenmodifikationen durch SA-fähige Moleküle, die unterschiedliche Affinitäten zu metalloxidischen Oberflächen aufweisen, liefern ein großes Potential hinsichtlich einer spezifischen Proteinadsorption und Zellanbindung. Untersuchungen haben gezeigt, dass auf mikrostrukturierten $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$ -Oberflächen Organophosphorsäure-derivate gut aus dem wässrigen Milieu auf Titandioxidflächen adsorbierten, aber auch unter bestimmten Parametern eine Adsorption auf den Siliziumdioxidflächen möglich war. Die Si-

O-P-Bindungen resultierten aus der Heterokondensation von Si-OH und P-OH und wurden ausschließlich aus organischen, aprotischen Lösungsmitteln, wie Toluol und anschließendem Tempern unter Vakuum gebildet [78]. Phosphonsäuren konnten aus THF adsorbiert und nach Verdampfung des Lösungsmittels und Tempern des Substrates SAMs nachgewiesen werden [79]. Bei dem Adsorptionsversuch einer Organophosphorsäure aus wässrigem Medium wurde keine Oberflächenmodifikation an Siliziumdioxid festgestellt [71]. Diese Tatsache beruht auf der hohen Hydrolyseempfindlichkeit der Si-O-P-Bindung und eröffnet somit die Möglichkeit einer selektiven Anbindung von Alkylphosphonsäure- und Monoalkylphosphorsäurederivate auf TiO₂ an strukturierten SiO₂/TiO₂-Oberflächen [80].

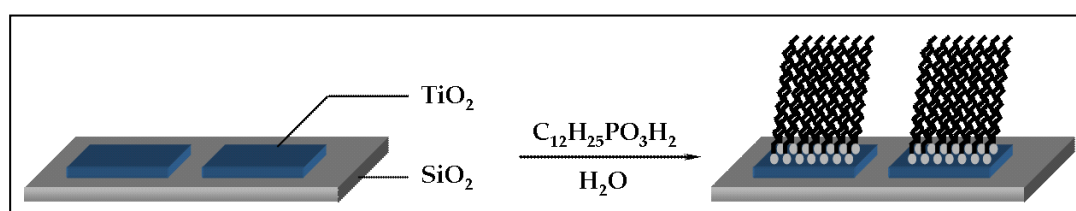


Abbildung 2-11: Selektive Oberflächenmodifizierung einer mikrostrukturierten SiO₂/TiO₂-Oberfläche mit Dodecylphosphonsäure (C₁₂H₂₅PO₃H₂) [80]

2.5 Poly(ethylenglykol) und Oligo(ethylenglykol): Eine Alternative zur Kontrolle der unspezifischen Proteinadsorption

Die unspezifische Wechselwirkung von Proteinen mit künstlichen Oberflächen spielt in vielen medizinischen, biochemischen und biotechnologischen Anwendungen eine zentrale Rolle. Da unspezifische Proteinadsorptionsprozesse eine wesentliche Fehlerquelle in der biomedizinischen Analytik darstellen, ist die Kenntnis über Art, Menge und Konformation unspezifisch angebundener Proteine eine wichtige Voraussetzung für die Herstellung biokompatibler Materialien. Besonders interessant sind in diesem Zusammenhang Oberflächenbeschichtungen, die unspezifische Proteinanlagerungen unterbinden und so die Körperverträglichkeit des Materials deutlich verbessern. Darüber hinaus sollen durch den Einbau ausgewählter funktioneller Gruppen gezielt Bioliganden angebunden werden.

Poly(ethylenglykol) (PEG) wurde in den vergangenen Jahren intensiv hinsichtlich einer Anwendung im biomedizinischen Bereich untersucht, da das immobilisierte PEG die

Proteinadsorption an Oberflächen deutlich senkt. Es wurden viele Modelle zur Erklärung dieses Effektes erstellt, dabei konnten Abhängigkeiten von der Kettenlänge des PEG/OEG sowie der Packungsdichte der SA-Monoschicht festgestellt werden, wobei der tatsächliche Mechanismus der Proteinabstoßung umstritten bleibt. Im Allgemeinen beruht die proteinresistente Wirkung der immobilisierten Ketten auf dem Vermögen, Wasserstoffbindungen direkt zu Wassermolekülen, aber nicht zu wasserstoffbindungsbildenden Gruppen eines Proteins aufzubauen, auf der Ausbildung einer hoch geordneten Struktur der Ketten innerhalb der PEG-Schicht sowie dem komplexen Phasenverhalten in wässriger Umgebung. Die zwei meist beschriebenen Theorien in der Literatur sind die „Sterische Abstoßung“ und der Effekt der „Wasserbarriere“, die aus der Struktur des Wasser in der näheren Umgebung der PEG-Ketten hervorgehen [81]. Die Theorie der sterischen Repulsionseffekte wurde entwickelt, um die Proteinresistenz PEG-terminierter Filme auf rationale Art zu erklären. Der Zustand der PEG-Schicht wird dabei als ein Hydrogel betrachtet. Unter einem Hydrogel versteht man eigentlich ein wasserquellbares, dreidimensionales Polymernetzwerk, welches durch verschiedene Stimuli (z.B. Ionen) quellen bzw. entquellen kann. PEG liegt nicht vernetzt vor, das Modell kann aber angewandt werden, da PEG aufgrund seiner hydrophilen Struktur große Mengen an Wasser einlagern kann [82]. Nähert sich ein Proteinmolekül aus der Lösung dieser Oberfläche, werden die Polymerknäuel zusammengepresst und entwässert. Beide Vorgänge bewirken eine Abstoßung des Proteinmoleküls und verhindern so die Proteinadsorption an der Materialoberfläche („steric repulsion“). Da auch Zellen keine Haftproteine auf der Oberfläche deponieren können, wird durch die an der Oberfläche immobilisierte PEG-Schicht die Zelladhäsion ebenfalls wirksam unterdrückt. Das Modell der sterischen Repulsion versagt aber bei der Beschreibung der Proteinresistenz dichtgepackter, selbstaggregierender Monolagen von OEG-terminierten Alkanthiolen [83]. Bei OEG-Schichten spielt zusätzlich die Packungsdichte und damit die Konformation der OEG-Kette (helikal oder all-trans) eine Rolle. Bei immobilisierten Tri(ethylenglykol)-terminierten Alkylthiolen auf Gold liegt eine helikale Struktur, die nach *Harder et al.* [84] effektive proteinresistente Schichten bildet, vor. SA-Schichten auf Silbersubstraten bilden bevorzugt eine all-trans Konformation aus, die im Gegensatz zur helikalen Struktur nachweislich signifikante Proteinmengen adsorbieren [84]. Ein theoretisches thermodynamisches Modell, das durch *Latour* [83] entwickelt wurde, zeigte dass der Enthalpieeffekt mit einem

zusätzlichen Entropieverlust eine signifikante Rolle spielt. Andere Theorien versuchten die proteinabstoßenden Kräfte von immobilisierten PEG-Ketten an Oberflächen mit der Ausbildung von elektrostatischen Doppelschichten, der Ausbildung von Hydroxidionen oder durch die Adsorption von Luftbläschen im Nanometerbereich zu erklären [84].

Die Verwendung von auf Substratoberflächen immobilisierten PEG ist aber auch mit einigen Nachteilen verbunden, wie der thermischen Instabilität und der Neigung zur Autooxidation in Gegenwart von Sauerstoff, sodass nach neuen Beschichtungsmaterialien gesucht wird [46]. Eine weitere Einschränkung bei der Verwendung von PEG liegt darin, dass eine Funktionalisierung nur sehr schwer und demzufolge eine definierte Anbindung an eine Substratoberfläche nicht möglich ist. Aus diesem Grund wurden die im Folgenden beschriebenen SA-fähigen Moleküle entwickelt.

Die am meisten untersuchten Standardsysteme für biologische und biochemische Anwendungen sind auf Goldoberflächen immobilisierte Alkanthiole mit terminalen Oligo(ethylenglykol)einheiten [9, 12, 40]. *Nagasaki et al.* [85] untersuchten die Proteinresistenz gegenüber BSA sowie die Möglichkeit einer spezifischen Anbindung von Streptavidin in Abhängigkeit von der Packungsdichte und der Kettenlänge der PEG-Ketten. Dabei zeigte sich eine hervorragende Proteinresistenz der immobilisierten PEG-Ketten auch auf nicht dicht gepackten Oberflächen. Eine Steigerung der Menge an gebundenen Streptavidin konnte an Oberflächen beobachtet werden, die eine hohe Packungsdichte aufwiesen. Eine sehr gute Proteinresistenz konnte ebenfalls mit der Einführung von Polyglycidol an Alkanthiole erreicht werden [46]. Ein weiterer viel versprechender Ansatz ist die Nutzung des positiv geladenen graft-Copolymeren Poly(L-lysin)-g-poly(ethylenglykol) (PLL-g-PEG). Durch die spontane Adsorption aus wässriger Lösung bildet es auf negativ geladenen Oberflächen, wie Nb_2O_5 und TiO_2 eine dicht gepackte Monoschicht, die eine sehr hohe Proteinresistenz aufweist [53, 56, 57].

2.6 Oberflächen in Kontakt mit dem biologischen System

Die erste und wichtigste Reaktion auf die Platzierung eines künstlichen Materials in ein biologisches System (Körper, Körperflüssigkeit) ist die Adsorption von Proteinen an der Oberfläche. Zellen, die sich ebenfalls in der Körperflüssigkeit befinden, würden nicht mit

dem reinen Implantatmaterial interagieren, sondern mit Proteinen, die sich bereits auf der Oberfläche befinden. Die Menge, Beschaffenheit und Konformation der adsorbierten Proteine beeinflusst und regelt alle nachfolgenden biologischen Reaktionen auf der Materialoberfläche, wie antigene Reaktionen, die Anlagerung und das Wachstum von Zellen [86]. Beispielsweise kann die Adsorption von Blutproteinen, wie Fibrinogen, die Anlagerung von Thrombozyten oder Makrophagen beeinflussen und somit zu einem Thrombus oder zu einer Faserverkapslung führen. Biologischen Reaktionen sind stark zeitabhängig, was die folgenden Beispiele zeigen sollen. Die Integration eines Implantats in den Knochen ist ein sehr langwieriger Prozess, der von der Beschaffenheit des Implantatmaterials sowie der körperlichen Situation abhängt. Dagegen ist die Blutgerinnung an der Grenzfläche [87] zu einem biokompatiblen Material ein sehr schneller Prozess, der innerhalb der ersten Minuten bis Stunden nach der Implantation abläuft und durch Proteine gesteuert wird. Es ist somit sehr wichtig, die an der Grenzfläche zu einem Implantat ablaufenden Prozesse in die richtige Richtung zu steuern. Aus diesem Grund sind intensive Studien zu den Wechselwirkungen zwischen Proteinen und den Oberflächen besonders auf dem Gebiet der Biomaterialforschung und Biotechnologie von großer Bedeutung.

In den nachfolgenden Kapiteln soll ein allgemeiner Überblick über die Proteinadsorption an Oberflächen gegeben werden.

2.6.1 Proteinadsorption

Die treibenden Kräfte der Proteinadsorption haben sowohl enthalpischen als auch entropischen Charakter. Wird bei der Adsorption die Enthalpie gesenkt ($\Delta H < 0$) oder die Entropie erhöht ($\Delta S > 0$), resultiert gemäß der Gleichung:

Gleichung 2-1: Gibbs-Helmholtz-Gleichung

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

G: GIBBS Energie, H: Enthalpie, S: Entropie, T: absolute Temperatur

eine Abnahme der GIBBS-Energie und damit eine Immobilisierung des Proteins an der Grenzfläche. Der allgemeine Mechanismus zur Adsorption von Proteinen wurde ausführlich von *Wahlgren et al.* [86], *Mrksich und Whitesides* [88] beschrieben. Aufgrund der komplizierten

Prozesse, die in der Natur ablaufen, wird in der Literatur auf ein Modell zurückgegriffen, indem der einfachste Fall angenommen wird. Wie in Abbildung 2-12 skizziert, hängt die Proteinadsorption an ein Substrat von den physikalischen und chemischen Eigenschaften ab. Die einzelnen Schritte sind zeitlich gestaffelt. Abbildung 2-12 (a): Diffusionskontrolliert und daher im Bereich von weniger als einer Millisekunde erreichen kleine Proteine, wie Albumin, die im Kulturmedium gelöst vorliegen, die Substratoberfläche und treten mit ihr in Wechselwirkungen. Diese Wechselwirkungen beruhen auf elektrostatischen und dispersiven (Van-der-Waals-) Kräften sowie zum Teil auch auf Wasserstoffbrücken und auf chemischen Bindungen. Die Verdrängung von gebundenen Wassermolekülen von der Substratoberfläche und aus der Hydrathülle der gelösten Proteine stellt einen hohen Entropiegewinn dar, der die Enthalpieeffekte überkompensiert. Bei den meisten Substratmaterialien überwiegen die attraktiven Wechselwirkungen, sodass daraus eine Proteinadsorption auf dem Substrat resultiert.

Nach einer gewissen Verweilzeit können die adsorbierten, flexiblen Proteinmoleküle mehr und mehr deformiert werden und dabei weitere Bindungen zum Substrat ausbilden. Dieser Effekt spielt insbesondere bei hydrophoben Oberflächen eine große Rolle, da durch die Umorientierungen im Gerüst der adsorbierten Proteine günstige Wechselwirkungen zu den hydrophoben Proteinbereichen gebildet werden, die in wässrigen Lösungen durch die Faltung der Polypeptidkette besonders im Kernbereich des Moleküls zu finden sind. Bei hoher Packungsdichte der Proteine spielen zusätzlich zu den Protein/Substrat-Wechselwirkungen auch Protein/Protein-Wechselwirkungen innerhalb des Adsorbates eine Rolle. Beide Wechselwirkungen machen die Desorption eines Proteinmoleküls, die eine simultane Lösung der zahlreichen Bindungen erfordert, immer unwahrscheinlicher. Durch die Deformation und Blockierung aktiver Zentren wird aber auch die biologische Funktion des adsorbierten Proteins gestört, es wird denaturiert (Abbildung 2-12 (b), Mitte). Große Proteine, wie Fibrinogen, die durch ihre geringere Diffusionsgeschwindigkeit die Substratoberfläche etwas später erreichen, sind teilweise in der Lage, bereits adsorbierte Proteine zu verdrängen, indem sie die Oberflächenplätze, die durch kleinere Proteine temporär frei werden, besetzen und damit die kleineren Proteinmoleküle unterwandern (Abbildung 2-12 (b), rechts). Daraus resultiert eine zeit- und konzentrationsabhängige Zusammensetzung der Proteinschicht.

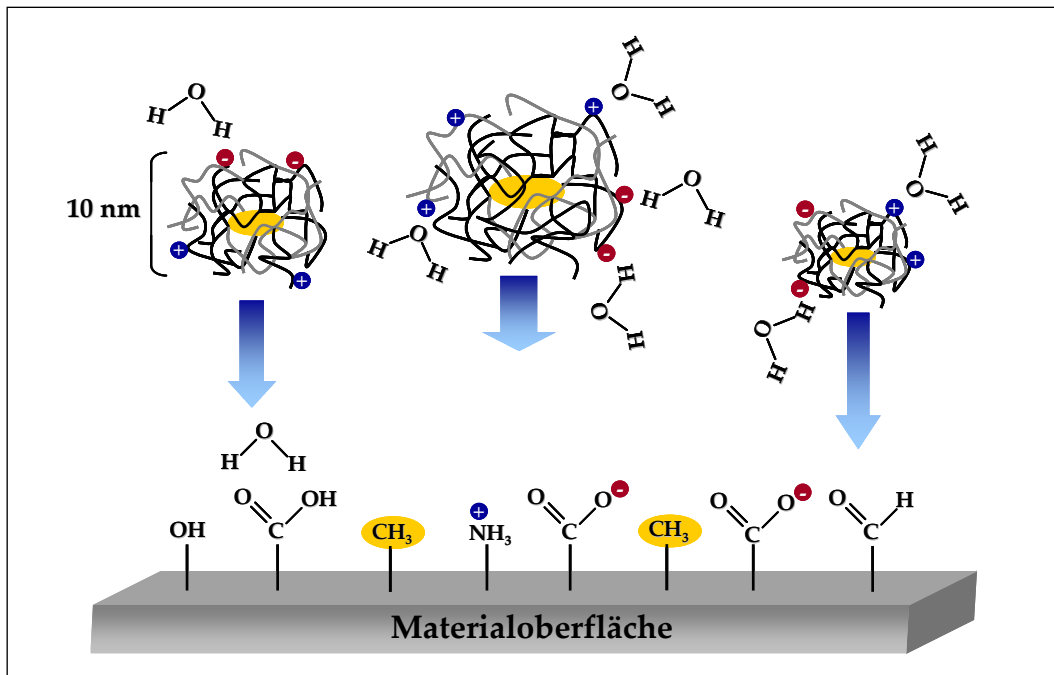


Abbildung 2-12 (a): Modell der Proteinadsorption an einer Biomaterialoberfläche, die eine Vielzahl chemisch funktioneller Gruppen trägt. Hydrophile Gruppen des Substrates und des Proteins sind von assoziierten Wassermolekülen umgeben [88].

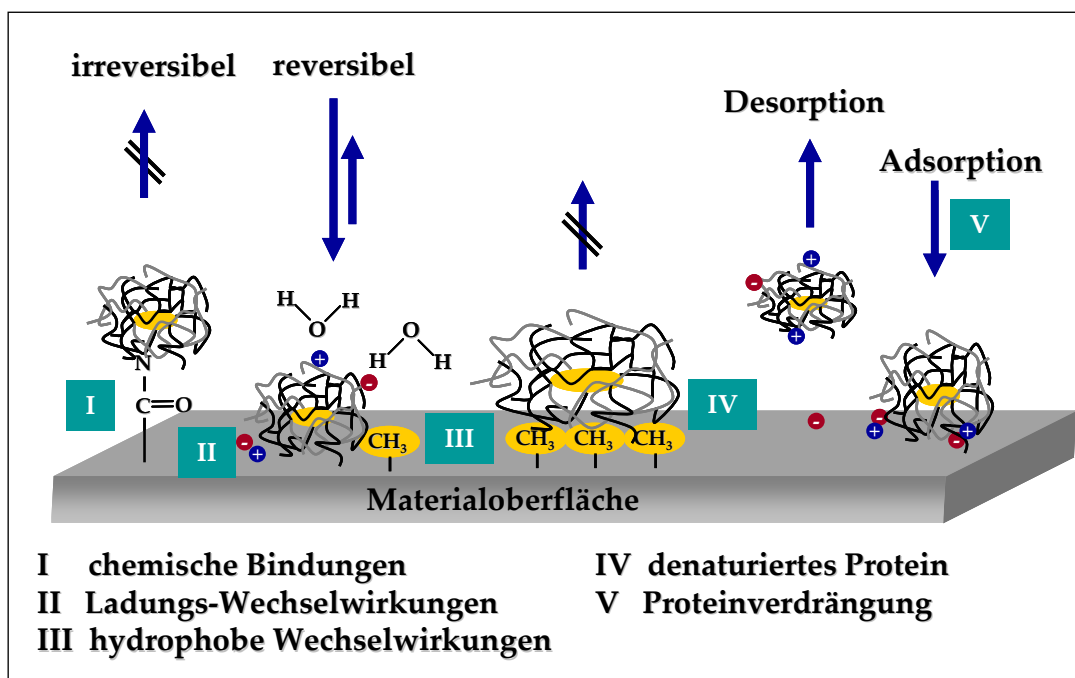


Abbildung 2-12 (b): Modell der Proteinadsorption an einer Biomaterialoberfläche; Entstehung und Veränderung des Proteinadsorbats [88].

Der Adsorptionsprozess von Proteinen an einer Oberfläche ist im Allgemeinen sehr kompliziert hinsichtlich der Konformationsänderung und/oder Denaturierung des adsorbierten Proteins sowie der unterschiedlichen Mikroumgebungen an der Oberfläche. Die Adsorption kann durch Heterogenitäten in der Oberfläche, durch die Anwesenheit und

Konformation anderer Proteine, durch Van-der-Waals- und Coulomb-Wechselwirkungen, durch den hydrophoben Effekt sowie durch das Redox/Korrosionspotential beeinflusst werden. Ein Hauptfaktor, der sich auf die Proteinadsorption auswirkt, ist der hydrophobe Effekt [89]. Er beruht auf der Freisetzung von Oberflächenwasser, wenn in einer wässrigen Lösung zwei hydrophobe Oberflächen in Kontakt treten. Wassermoleküle können mit einer hydrophoben Oberfläche keine Wasserstoffbrückenbindungen eingehen, stattdessen bilden sie eine käfigartige Struktur, in der ihre Umorientierung eingeschränkt ist. Aus thermodynamischer Sicht lässt sich diese Struktur mit einer erniedrigten Entropie beschreiben. Werden die Wassermoleküle wieder freigesetzt, steigt die Entropie. Sie ist somit die treibende Kraft für die Proteinadsorption. Das heißt, dass auf hydrophoben Oberflächen größere Mengen an Proteinen anbinden können als auf hydrophilen [90]. Diese Adsorption äußert sich in einer Irreversibilität und in z.T. ausgeprägten Konformationsänderungen der Proteinmoleküle. Mit der Dominanz dieser entropischen treibenden Kraft kann auch das „inerte“ Verhalten von PEG-modifizierten Oberflächen gegenüber Proteinen begründet werden. Bezüglich der Oberflächenladung wurde von *Norde et al.* [90] festgestellt, dass auf geladenen Oberflächen mehr entgegengesetzt geladene Proteine adsorbieren als Proteine mit gleicher Ladung. Diese Trends sind einfach nachvollziehbar, jedoch existiert eine Vielzahl von Wechselwirkungen zwischen den funktionellen Gruppen der Proteine, der Materialoberfläche und der umgebenden Körperflüssigkeit, die von so komplexer Natur sind, dass sie bisher noch nicht geklärt werden konnten. Ein Problem stellt dabei der Zustand des Proteins (Konformation, Orientierung, biologische Aktivität) nach der Adsorption dar. Ein Grund dafür ist auf die unspezifische Proteinadsorption zurückzuführen. Sie sollte deshalb möglichst minimiert bzw. komplett unterbunden werden, damit nur gewünschte Proteine spezifisch adsorbieren und somit Prozesse zwischen dem biokompatiblen Material und dem biologisch umgebenden Medium vorhersehbar und folglich kontrollierbar werden. Es ist wichtig, viel Potential in die Erforschung von biokompatiblen Oberflächen zu investieren, um die Orientierung spezifisch adsorbierter Proteine zu kennen. Damit ist die direkte Anwendung von definierten, biologisch aktiven Proteinen für ein gezieltes Zellwachstum möglich. Eine weitere Applikation für eine spezifische Proteinanbindung wäre ein Biosensor, der in der Lage ist, aus einem komplexen Proteingemisch ein bestimmtes Protein über die Ausbildung einer definierten Bindung an einer Substratoberfläche zu immobilisieren.

3. Synthese und Charakterisierung neuer self-assembly-fähiger Moleküle

Aus der Literatur ist bekannt, dass auf Goldoberflächen immobilisierte OEG-terminierte Alkanthiole dicht gepackte, gut orientierte Monoschichten ausbilden und die hervorragende Eigenschaft besitzen, resistent gegenüber unspezifischer Proteinanbindung zu sein [8 – 12]. Da eine Adsorption der SA-fähigen Alkanthiole nur auf Gold- und Silberoberflächen limitiert ist, war die Entwicklung von definierten Tri(ethylenglykol)-terminierten Monoalkylphosphorsäure- und Alkylphosphonsäuremolekülen essentiell. Durch Einführung von terminalen, funktionellen Gruppen konnte außerdem eine spezifische Anbindung von Proteinen erreicht werden.

3.1 Strukturkonzept – Ziel und Strategie

Das Ziel dieser Dissertation basierte auf der Kombination von funktionalisierten Oligo(ethylenglykol) (OEG)-Einheiten mit Alkylphosphorsäure- und Alkylphosphonsäurederivaten und somit auf der Darstellung definierter Moleküle [16], die auf planaren, reaktiven metalloxidischen Oberflächen stabile SAMs ausbilden. Abbildung 3-1 zeigt den schematischen Aufbau dieser Moleküle.

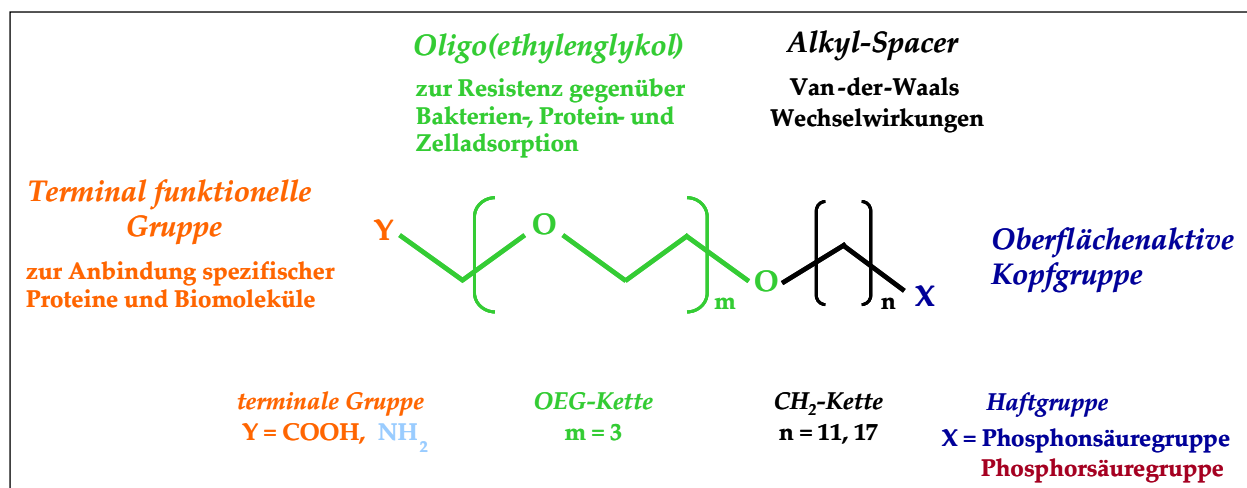


Abbildung 3-1: Schematische Darstellung des Aufbaus von Alkylphosphonsäure- und Monoalkylphosphorsäurederivaten

Die entwickelten Moleküle sind generell in vier unterschiedlich funktionelle Teile untergliedert:

Kopfgruppe: Monoalkylphosphorsäure- und Alkylphosphonsäurederivate bilden gut definierte, hydrolytisch stabile Monoschichten auf reaktiven Metallen, wie TiO_2 und Al_2O_3 aus. Im Rahmen dieser Arbeit bilden sie damit die Grundlage für eine Oberflächenfunktionalisierung. Die Phosphat- bzw. Phosphonatgruppe fungiert in den synthetisierten Verbindungen als oberflächenaktive Kopfgruppe und dient zur kovalenten Anbindung der Moleküle an metalloxidische Oberflächen [91 – 93].

Die Adsorption von z.B. Alkylphosphonsäurederivaten auf Aluminiumoxidoberflächen erfolgt über eine Säure-Base-Kondensation. Der Reaktionsmechanismus verläuft über drei Stufen, es resultiert der favorisierte Tridentat-Komplex, bei dem die Kopfgruppe über eine dreisymmetrische P-O-Al-Bindung an die oxidische Oberfläche gebunden ist [94]. Theoretische Berechnungen der Infrarot- Adsorptionsspektren von Alkylphosphonsäuren auf hydroxyl-terminierten $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ -Oberflächen zeigen, dass eine Anbindung der Phosphonatgruppe als Monodentat, Bidentat oder Tridentat (Abbildung 3-2) erfolgen kann. Dabei wird der Tridentat-Komplex bevorzugt ausgebildet, was auch experimentell ermittelte IR-Adsorptionsspektren bestätigen [75].

Durch die Nutzung der Phosphatgruppe als auch der Phosphonatgruppe kann eine Abhängigkeit der Stabilität der SAMs auf Metalloberflächen untersucht werden.

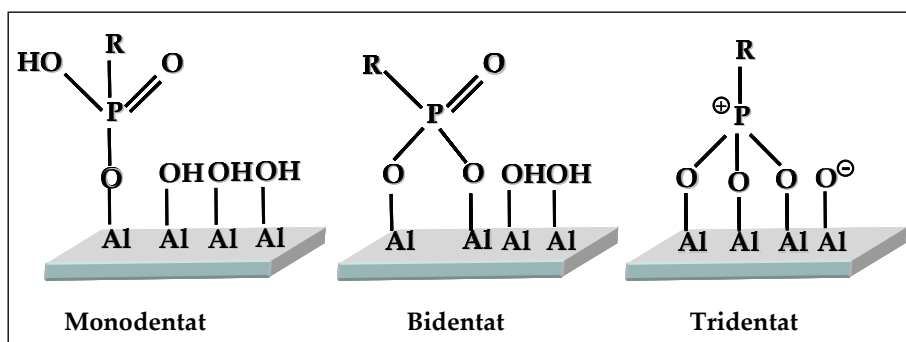


Abbildung 3-2: Schematische Darstellung der Anbindungsmöglichkeiten von Alkylphosphonsäurederivaten an Aluminiumoxidoberflächen nach [75]

Alkyl-Spacer: Die Alkylkette, der sogenannte Spacer, ist verantwortlich für die Ordnung und Ausrichtung der SAMs auf der Metalloxydoberfläche. Aufgrund von Van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen den hydrophoben Alkylketten ist eine geordnete Ausrichtung der Moleküle möglich. Um eine Abhängigkeit der Adsorptionskinetik, der Stabilität der SAMs und der Packungsdichte von der Kettenlänge zu untersuchen, wurden zwei verschieden lange Alkylketten (C_{11} und C_{17}) verwendet [95].

Oligo(ethylenglykol)-Einheit: Zahlreiche Untersuchungen [8 – 12, 42 – 44, 48 – 57] belegen, dass Poly(ethylenglykol) (PEG) gegen Bioadhäsion wirkt. PEG, das auf Metalloxydoberflächen immobilisiert wurde, bewirkt eine Resistenz gegenüber unspezifischen Bakterien- und Proteinadsorptionen sowie Zellanlagerungen [1 – 7]. Vorausgehende Studien belegen, dass eine zunehmende Resistenz von PEG im direkten Zusammenhang mit der Packungsdichte sowie der Länge der PEG-Ketten steht. Die Reduzierung der unspezifischen Adsorption beruht auf sterischer Repulsion, osmotischen Effekten, Grenzflächenladungen sowie der Konformation der PEG-Ketten [96 – 99].

In dieser Arbeit wurde als OEG-Einheit für die synthetisierten Verbindungen definiertes Tri(ethylenglykol) und für die Oberflächenreaktionen definiertes Hexa(ethylenglykol) sowie hochverzweigtes Polyglycidol verwendet, um die Abhängigkeit der Resistenz modifizierter Oberflächen gegenüber Biomolekülen zu testen.

Terminale funktionelle Gruppe: Zur Schaffung einer spezifischen Proteinadsorption an der Grenzflächen zwischen biologischer Umgebung und synthetischem Material wurden terminale funktionelle Gruppen eingeführt (COOH , NH_2), die eine gezielte, spezifische Anbindung von Biomolekülen (Biotin, Streptavidin, Poly-L-Lysin) an der beschichteten Metalloxydoberfläche ermöglichen.

Es wurden die in Abbildung 3-3 dargestellten Moleküle synthetisiert sowie anschließend der SA-Prozess und die physicochemischen Eigenschaften der resultierenden SAMs auf TiO₂ und Al₂O₃ untersucht. Die funktionalisierten Oberflächen wurden weiterführend für Oberflächenreaktionen sowie für spezifische und unspezifische Proteinadsorptionsstudien genutzt. Um proteinresistente Oberflächen zu erzeugen, wurden zwei mögliche Wege verfolgt; zum Einen die direkte Substitution des Ethylenglykols an die jeweiligen Verbindungen (Abbildung 3-3 (a)-(c)) und zum Anderen die Einführung der Oligo(ethylenglykole) über Oberflächenreaktionen an eine reaktive, dicht gepackte Monoschicht der carboxylterminierten Alkylphosphonsäure, die als Linker fungiert (Abbildung 3-3 (d)).

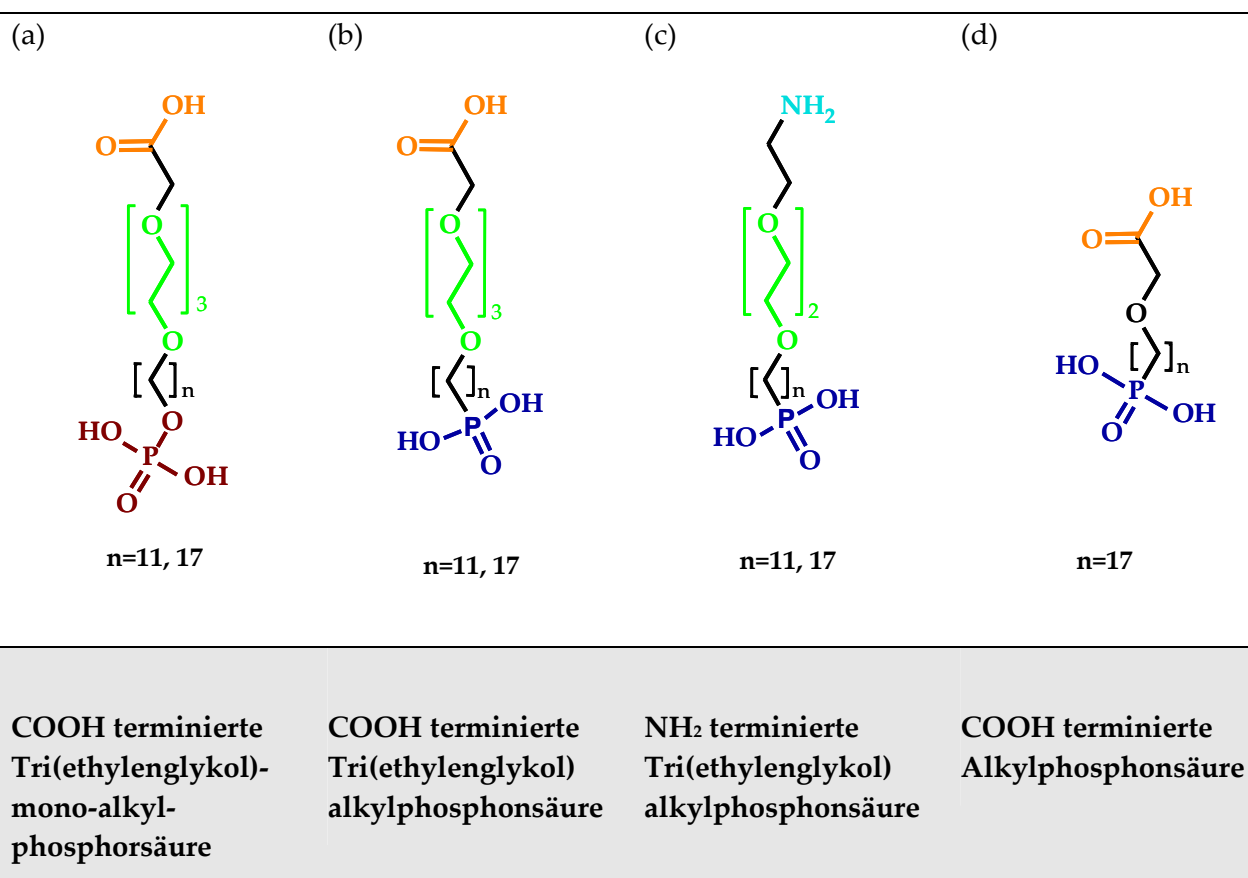


Abbildung 3-3: Synthetisierte Monoalkylphosphorsäure- und Phosphonsäurederivate

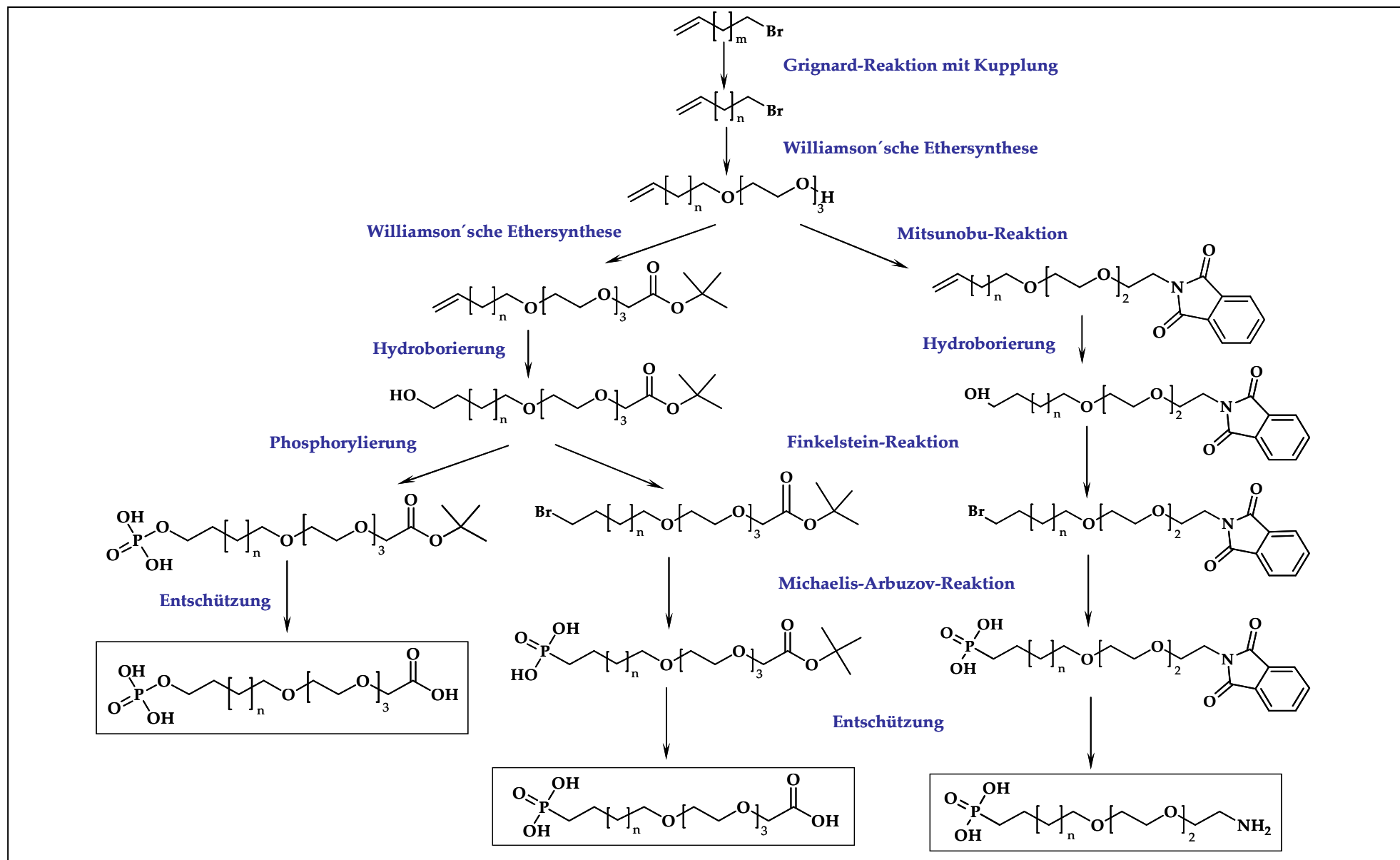


Abbildung 3-4: Allgemeines Reaktionsschema

3.2 Grundlagen zur Darstellung funktionalisierter OEG-terminierter Monoalkylphosphorsäure- und Alkylphosphonsäurederivate

In der vorliegenden Arbeit wurden die konzipierten, SA-fähigen Moleküle nach bekannten Synthesestufen aus der Literatur dargestellt. Eine neue Kombination dieser Reaktionen sowie die Variation der Reaktionsparameter führten zu neuartigen, in der Literatur noch nicht beschriebenen Verbindungen. Bei der Darstellung der in Abbildung 3-3 (a)-(c) gezeigten Zielverbindungen handelte es sich um Mehrstufensynthesen, die fünf bis sieben Reaktionsschritte umfassten. Im Folgenden sollen die Reaktionsmechanismen der bekannten Namensreaktionen beschrieben werden. Abbildung 3-4 zeigt dazu das allgemeine Reaktionsschema.

3.2.1 Reaktionsmechanismus der Grignard-Reaktion mit anschließender Kupplungsreaktion

Bromalkene mit definierter Kettenlänge lassen sich über eine metallorganische Reaktion, der so genannten Grignard-Reaktion mit anschließender Kupplung darstellen. Dazu wird zunächst das Grignard-Reagenz gebildet, das sich von einem Bromalken und Magnesium ableitet. Die wesentliche Methode zur Darstellung kann wie folgt allgemein formuliert werden:

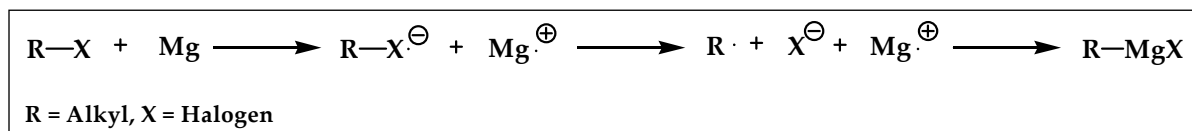


Abbildung 3-5: Allgemeine Darstellung des Grignard-Reagenzes

Die Umsetzung eines Bromalkens mit Magnesium ist eine heterogene Reaktion und findet an der Oberfläche des Metalls statt. Das hergestellte Grignard-Reagenz wird in der zweiten Teilreaktion, der Kupplungsreaktion eingesetzt. Dabei bildet der Katalysator Li_2CuCl_4 zusammen mit der metallorganischen Verbindung eine Cu(I)-Spezies aus, die mit weiterem Grignard-Reagenz zu einer Organokupferverbindung reagiert, welche mit einem oder zwei magnesiumorganischen Molekülen konstituiert ist. Die Cu(I)-Spezies reagiert vermutlich über

radikalische Zwischenstufen weiter mit einem Dibromalkan zum gewünschten Bromalkan. Der Mechanismus könnte nach [100] wie folgt verlaufen:

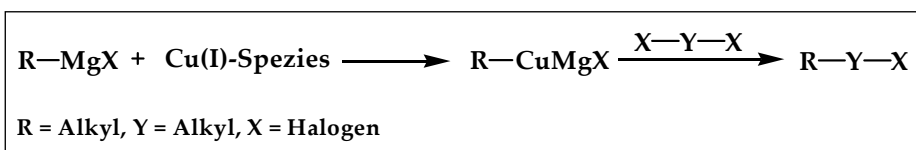


Abbildung 3-6: Mechanismus der Kupplungsreaktion [100]

3.2.2 Reaktionsmechanismus der Williamson'schen Ethersynthese

Bei der Williamson'schen Ethersynthese reagiert das Alkalisalz eines Alkohols (Alkoholat) mit einem Alkylhalogenid [101]. Das Alkoholat wird durch die Reaktion eines α -ständigen Alkohols mit einer starken Base, z.B. Natronlauge oder Natriumhydrid, dargestellt. In einer Gleichgewichtsreaktion abstrahiert die Base ein Proton der Hydroxygruppe des Alkohols (Tri(ethylenglykol), wobei das Monoalkoholat als gewünschte Zwischenstufe entsteht. Als Nebenprodukt kann durch den Einsatz von Tri(ethylenglykol) ebenfalls das ungewünschte Di-Alkoholat gebildet werden. Um diese Reaktion weitestgehend zu unterbinden, wird der Alkohol im fünffachen Überschuss eingesetzt.

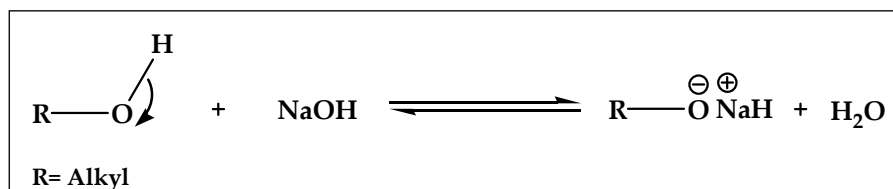


Abbildung 3-7: Allgemeine Darstellung des Alkoholats [101]

In einer nucleophilen Substitutionsreaktion (S_N2) greift nun der negativ geladene Alkoholat-Sauerstoff das Bromalkan an dem Brom benachbarten C-Atom an, das eine positive Partialladung besitzt. Es wird der Monoether als gewünschtes Reaktionsprodukt gebildet.

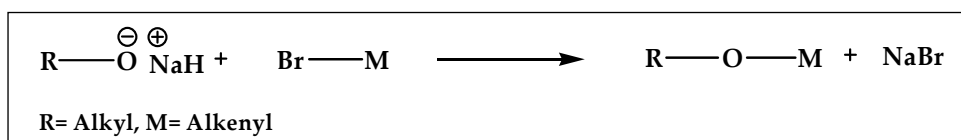


Abbildung 3-8: Mechanismus der Williamson'schen Ethersynthese

3.2.3 Reaktionsmechanismus der Hydroborierung

Die Hydroborierung dient der Darstellung α -ständiger Alkohole aus Olefinen. Zur Reaktion wird das Reagenz 9-Borabicyclo[3.3.1]nonan (9-BBN) verwendet, das aufgrund seines hohen sterischen Anspruchs sehr selektiv reagiert.

Die Hydroborierung beginnt mit einer syn-Addition des Borans an die C-C-Doppelbindung [102]. Dabei stellt das Boratom das Elektrophil dar. Es wird ein Vierzentren-Übergangszustand durchlaufen. Aufgrund des sperrigen Substituenten am Boratom des 9-BBN, bindet das Boratom wegen einer geringeren sterischen Hinderung am terminalen C-Atom der Doppelbindung entgegen der Markovnikov-Regel an. Die Hydroborierung liefert zunächst ein Alkylboran, das anschließend mit Natronlauge und Wasserstoffperoxid zum α -ständigen Alkohol oxidiert wird. Dabei greift zunächst das Hydroperoxid-Anion nucleophil am Boratom an, gefolgt von einer Umlagerung unter Wanderung des Alkylrests und Abspaltung eines Hydroxyd-Ions. Durch die Einwirkung wässriger Natronlauge wird anschließend das entstandene Borat gespalten. Die Hydrolyse läuft nahezu vollständig ab, weil das inerte Natriumborat entsteht. Die Alkoholate werden im wässrigen Milieu zum Alkohol protoniert.

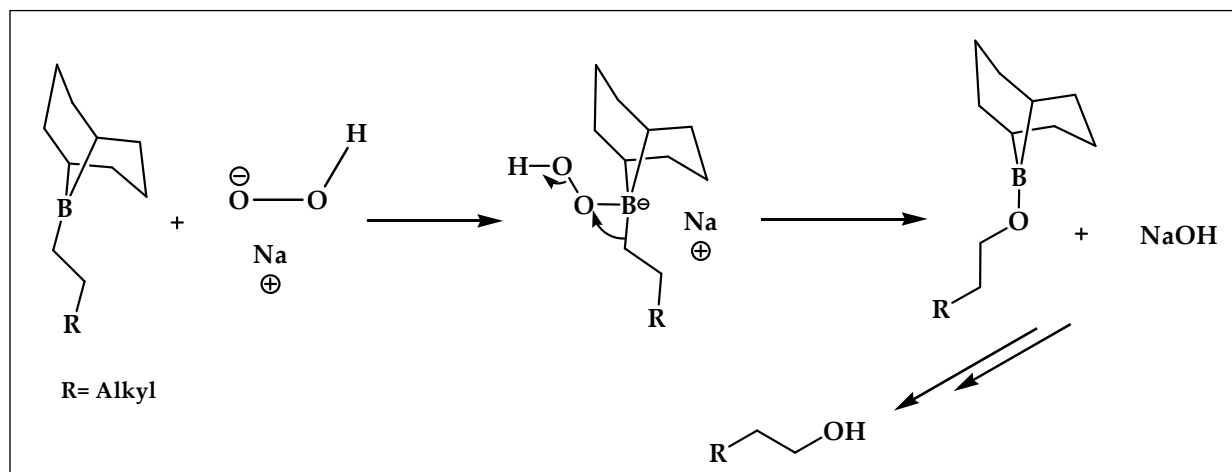


Abbildung 3-9: Mechanismus der Hydroborierung [102]

Bei dem dargestellten Alkohohl handelt es sich um ein Anti-Markovnikov-Produkt [101].

3.2.4 Reaktionsmechanismus der Phosphorylierung

Die Phosphorylierungsreaktion kann durch den folgenden allgemeinen Reaktionsmechanismus beschrieben werden [101].

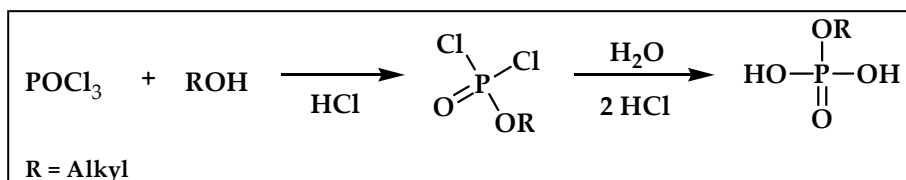


Abbildung 3-10: Mechanismus der Phosphorylierung

Es reagiert die α -ständige Hydroxygruppe eines Alkohols zunächst mit Phosphoroxychlorid und durch eine anschließende Hydrolyse zu einem monosubstituierten Phosphorsäureester. Als Katalysator und als säurebindendes Mittel agiert in dieser Reaktion das Triethylamin.

3.2.5 Reaktionsmechanismus der Finkelstein-Reaktion

Bei der Finkelstein-Reaktion, die aus zwei Teilreaktionen aufgebaut ist, erfolgt die Umwandlung eines terminalen Alkohols in die entsprechende Bromverbindung [102]. Die Darstellung des Bromids erfolgt über die Zwischenstufe des Tosylats, da eine direkte Substitution der Hydroxygruppe, die eine schlechte Abgangsgruppe darstellt, nur sehr schwer möglich ist. Die beiden Teilschritte der Finkelstein-Reaktion sind nucleophile Substitutionsreaktionen. Im ersten Reaktionsschritt wird der Alkohol zunächst als Tosylat aktiviert. Dabei greift das sich im Ring befindende N-Atom des 4-(Dimethylamino)-pyridin (DMAP) mit seinem freien Elektronenpaar nucleophil am N-Atom des Tosylchlorids an. Durch diese Umsetzung steigt die Reaktivität des Tosylderivates und das S-Atom kann leichter nucleophil vom O-Atom des Alkohols angegriffen werden. DMAP spaltet sich ab und abstrahiert dabei ein Proton der Hydroxygruppe. Das protonierte DMAP reagiert weiter mit dem im Überschuss eingesetzten Triethylamin und liegt danach unverändert der Reaktion wieder zur Verfügung und muss somit nur in katalytischen Maßstab eingesetzt werden.

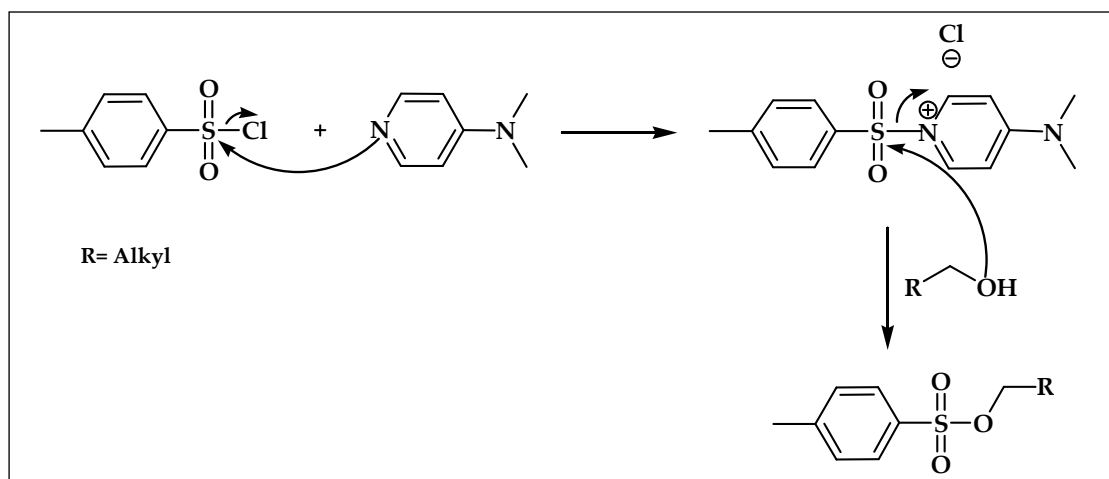


Abbildung 3-11: Mechanismus der Finkelstein-Reaktion; Tosylierung

Das Tosylat wird im zweiten Teilschritt der Finkelstein-Reaktion mit Lithiumbromid umgesetzt. Das Bromid-Ion greift nucleophil das positiv partialgeladene C-Atom des tosylierten Alkohols an. Der Tosylatrest spaltet sich als sehr gute Abgangsgruppe leicht vom Molekül ab, und es wird das Bromid erhalten.

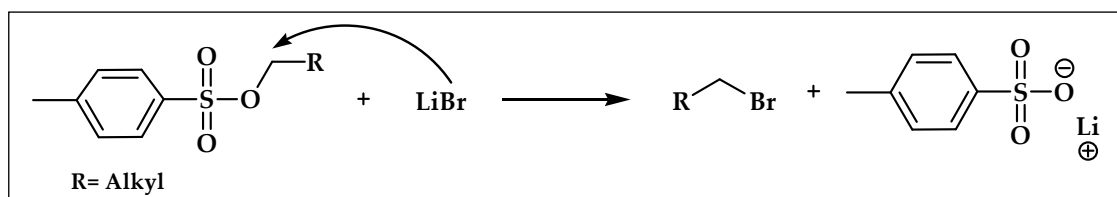


Abbildung 3-12: Mechanismus der Finkelsteinreaktion; Bromierung

3.2.6 Reaktionsmechanismus der Michaelis-Arbuzov-Reaktion

Die Darstellung eines Alkylphosphonsäureesters erfolgt über die Michaelis-Arbuzov-Reaktion [102]. Dabei wird im ersten Teilschritt dieser Reaktion das P-Atom des *tris*-Trimethylsilylphosphit alkyliert. Diese Alkylierung erfolgt durch einen nucleophilen Angriff des freien Elektronenpaares des Phosphors auf das, durch die Bindung zum Br-Atom positiv partialgeladene C-Atom des entsprechenden Bromalkans. Es entsteht unter der Abspaltung des Bromids eine stabile Zwischenverbindung mit einem quarternisierten P-Atom. Durch den Angriff des freigesetzten Bromids erfolgt nun die Abspaltung des Trimethylsilylbromids. Es entsteht ein Phosphonsäurederivat, das im zweiten Teilschritt der Reaktion mit einem Gemisch aus Methanol/Wasser hydrolysiert, d.h. die Trimethylsilyl-Schutzgruppe unter schwach sauren Bedingungen abgespalten werden kann.

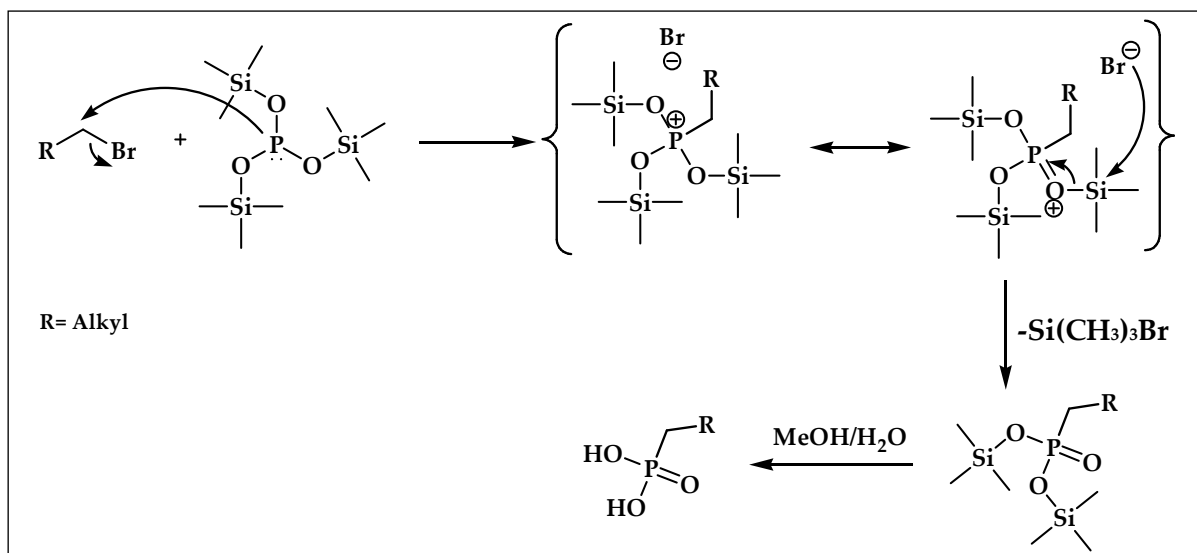


Abbildung 3-13: Mechanismus der Michaelis-Arbuzov-Reaktion

3.2.7 Reaktionsmechanismus der Mitsunobu-Reaktion

Die Umwandlung der terminalen Hydroxygruppe in eine Aminogruppe erfolgt mittels der so genannten Mitsunobu-Reaktion [102]. Dabei erfolgt der Einbau des Phthalimids als Aminoschutzgruppe. Der Mechanismus dieser Reaktion lässt sich in drei Schritte einteilen: 1. Addukt-Bildung, 2. Aktivierung des Alkohols und 3. S_N2 -Reaktion (Abbildung 3-14).

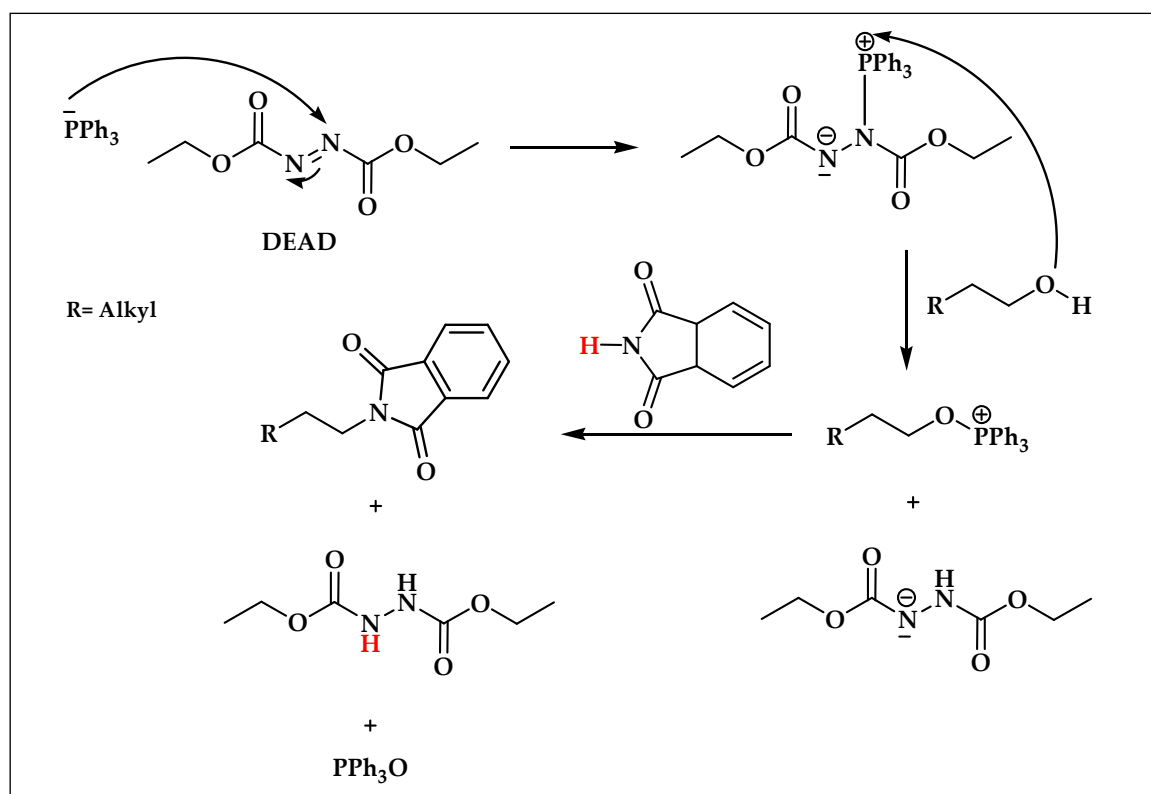


Abbildung 3-14: Mechanismus der Mitsunobu-Reaktion

Das P-Atom des Triphenylphosphin greift nucleophil mit seinem freien Elektronenpaar an einem N-Atom des Diethylazodicarboxylates (DEAD) an. Dieses Addukt reagiert mit einem terminalen Alkohol zum alkylierten Phosphinoxid. In dieses tritt das Phthalimid-Ion unter Rückseitenangriff ein und verdrängt somit die Abgangsgruppe O=PPh_3 . Durch die Entschützung der Phthalimidgruppe bildet sich die terminale Aminogruppe.

3.3 Material und Charakterisierungsmethoden

3.3.1 Chemikalienverzeichnis

Zur Darstellung der in Abbildung 3-3 aufgeführten Verbindungen sowie zur Durchführung der Oberflächenreaktionen wurden die in Tabelle 3-1 und 3-2 aufgeführten Chemikalien und Lösungsmittel verwendet.

Tabelle 3-1: Zusammenstellung der Chemikalien

Chemikalien	Hersteller	Vermerk
Ammoniumchlorid	Merck	z. A.
Biotin	Sigma	~99%
5-Brom-1-penten	Aldrich	99%
11-Brom-1-undecen	Sigma-Aldrich	95%
9-Borabicyclo-[3.3.1]-nonan	Fluka	0,5 M Lösung in THF
tert-Butylbromacetat	Merck	z. Synthese, >98%
1,12-Dibromdodecan	Aldrich	98%
Dicyclohexylcarbodiimid (DCC)	Sigma-Aldrich	99%
Dilithium-tetrachlorocuprat	Acros-Organics	0,1 M Lösung in THF
Diethylazodicarboxylat (DEAD)	Sigma-Aldrich	Lösung, 40% in Toluol
4-(Dimethylamino)-pyridin (DMAP)	Merck	z. Synthese
N-(3-Dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimid-hydrochlorid (EDC)	Fluka	purum $\geq 98\%$
Hexa(ethylenglykol)	Aldrich	97%

Hydrazin	Acros-Organics	Hydrat, 80%
N-Hydroxysuccinimid (NHS)	Aldrich	98%
Lithiumbromid	Riedel-de-Haen	z. Synthese
Magnesium-Späne	Riedel-de-Haen	nach Grignard
Magnesiumsulfat	Grüssing	99%, reinst, entwässert
Natriumchlorid	VWR	z. Synthese
Natriumhydrid	Acros-Organics	60% Dispersion in Mineralöl
Natriumhydrogencarbonat	Grüssing	99,5%, z. Analyse
Natriumhydroxid	Merck	Plätzchen, z. Analyse
Phosphoroxychlorid	Merck	98%
Phthalimid	Acros-Organics	99+%
Polyglycidol	HyperPolymers GmbH	2500 g/mol
Salzsäure	Merck	37%, rauchend
Schwefelsäure	Merck	95-97%, z. Synthese
Toluol-4-sulfonylchlorid	Merck	z. Synthese
Triethylamin	VWR	min. 99%
Tri(ethylenglykol)	Fluka	>99%, wasserfrei, H ₂ O-Gehalt<0,08%, getrocknet über Molekularsieb
Triphenylphosphin	Acros-Organics	99%
<i>tris</i> -Trimethylsilylphosphit	Merck	99%
Wasserstoffperoxid	J.T. Baker	30%ig

Tabelle 3-2: Zusammenstellung der Lösungsmittel

Lösungsmittel	Hersteller	Vermerk
Aceton		analytisch rein
Dichlormethan		analytisch rein
Diethylether		analytisch rein
Ethylacetat		analytisch rein
N,N-Dimethylformamid (DMF)	Acros	extra trocken, über Molekularsieb
n-Hexan		analytisch rein
Methanol		analytisch rein
Tetrahydrofuran (THF)	Acros	extra trocken, über Molekularsieb

Für die Reaktionskontrolle und Reinigung der Syntheseprodukte aus den einzelnen Stufen wurden die folgenden Materialien verwendet:

Tabelle 3-3: Materialien zur Reinigung der Syntheseprodukte

Materialien	Hersteller	Reinheit
Platten für die Dünnschicht- chromatographie	Merck	Kieselgel 60 F ₂₅₄ , DC-Alufolien
Kieselgel 60	Merck	0,04 – 0,063 mm, für die Säulen- Chromatographie

Zur Charakterisierung der Syntheseprodukte mittels NMR-Spektroskopie wurden die in Tabelle 3-4 aufgeführten deuterierten Lösungsmittel verwendet:

Tabelle 3-4: Lösungsmittel zur NMR-Spektroskopie

Lösungsmittel	Hersteller	Reinheit
Chloroform-d	Aldrich	99,8 atom%D
Methanol-d ₄	Aldrich	99,8+ atom%D

3.3.2 Charakterisierungsmethoden

Die Standardmethoden, wie NMR, FTIR und Elementaranalyse, wurden zur Charakterisierung der synthetisierten Verbindungen genutzt. Ebenso wurde das thermische Verhalten der Phosphorsäure- und Phosphonsäurederivate mittels DSC- und TGA-Messung untersucht.

NMR-Spektroskopie

Die Identifizierung der synthetisierten Verbindungen erfolgte durch die Anwendung der ¹H-, ¹³C- und ³¹P-NMR-Spektroskopie. Die Spektren wurden an den Kernresonanzspektroskopiegeräten der Fa. BRUKER DRX 500 (500 MHz) und BRUKER MSL 300 (300 MHz) gemessen und dazu die deuterierten Lösungsmittel Chloroform und Methanol verwendet. Für die Multiplizitäten wurden die Abkürzungen; s für Singulett, d für Duplett, t für Triplet, q für Quartett und m für Multiplett benutzt.

FTIR-Spektroskopie

Die Identifizierung der Syntheseprodukte erfolgte auch IR-spektroskopisch. Dazu wurde das Fourier-Transform-Infrarot-Spektrometer 5700 FTIR der Fa. NICOLET verwendet. Die Aufnahme der IR-Spektren erfolgte durch die Verwendung von KBr-Presslingen (1% dispergiert in KBr), mit einer Scanrate von 128 und einer Auflösung von $1,0\text{ cm}^{-1}$.

Elementaranalyse

Die synthetisierten Endverbindungen wurden zusätzlich elementaranalytisch auf den Gehalt an Kohlenstoff und Wasserstoff untersucht, um somit Rückschlüsse auf die elementare Zusammensetzung der Verbindungen führen zu können. Dazu wurde das Gerät der Fa. FISON CHNS-O EA 1108 verwendet.

DSC und TGA-Messungen

Das thermische Verhalten sowie die Schmelzpunkte der Phosphorsäure- und Phosphonsäurederivate wurden mittels der DSC- und TGA-Messung bestimmt. Die DSC-Messung wurde am Gerät der Fa. TA INSTRUMENTS DSC 2920 mit einer Aufheizrate von 5 K/min unter Stickstoff, in einem Temperaturbereich von $0\text{--}100^\circ\text{C}$, in vier aufeinander folgenden Aufheizraten sowie die TGA-Messung am Gerät METTLER TOLEDO TG 50 mit einer Aufheizrate von 10 K/min unter Stickstoff, in einem Temperaturbereich von $25\text{--}1000^\circ\text{C}$ durchgeführt. Der Schmelzpunkt wurde aus der DSC-Kurve der 2. Aufheizung bestimmt.

3.4 Synthese von carboxylterminierten Tri(ethylenglykol)-monoalkylphosphorsäuren

Die Darstellung der SA-fähigen Moleküle $\text{COOH-EG}_3\text{-C}_{11}\text{-PO}_4\text{H}_2$ und $\text{COOH-EG}_3\text{-C}_{17}\text{-PO}_4\text{H}_2$ erfolgte, um metalloxidische Oberflächen durch die Ausbildung einer stabilen Monoschicht zu modifizieren und für nachgeschaltete Proteinversuche zu nutzen.

Für die Beschichtung von Aluminiumoxid- und Titandioxidoberflächen wurde zunächst die Phosphatgruppe als selektiv wirkende Kopfgruppe eingeführt. Vorab getätigte Adsorptionsuntersuchungen mit der zuerst dargestellten Verbindung $\text{COOH-EG}_3\text{-C}_{11}\text{-PO}_4\text{H}_2$ zeigten die Ausbildung einer nicht dicht gepackten, instabilen Adsorbatschicht, die für nachfolgende

Proteinversuche nicht nutzbar war. Um diesen Problem entgegen zu wirken, wurde eine längere Alkylkette, die als Spacer im SA-Molekül fungiert, eingeführt und somit die Verbindung **COOH-EG₃-C₁₇-PO₄H₂** synthetisiert.

Bei der Darstellung der Verbindungen **COOH-EG₃-C₁₁-PO₄H₂** und **COOH-EG₃-C₁₇-PO₄H₂** handelte es sich um Mehrstufensynthesen, die fünf bzw. sechs Reaktionsschritte umfassten. Die erste Reaktionsstufe diente zum Aufbau des Spacers, einer Alkylkette, die 17 CH₂-Wiederholeinheiten besitzt und somit nur für die Darstellung der Verbindung **COOH-EG₃-C₁₇-PO₄H₂** notwendig war. Die Ausgangssubstanz 17-Brom-1-heptadecen konnte über die Durchführung einer Grignard-Reaktion und einer anschließenden Kupplungsreaktion dargestellt werden. Die nachfolgenden beiden Reaktionsstufen beschreiben nucleophile Substitutionsreaktionen, die nach dem Mechanismus einer Williamson'schen Ethersynthese verlaufen. Ausgehend vom Tri(ethylenglykol) wurde zunächst der Alkylspacer eingeführt und im anschließenden Reaktionsschritt die geschützte funktionelle Gruppe, der tert-Butylester an das Tri(ethylenglykol) substituiert. Im weiteren Reaktionsverlauf war es notwendig, mit einer geschützten Endgruppe zu arbeiten, um ungewünschte und unkontrollierte Umsetzungen dieser reaktiven Gruppe mit anderen Reagenzien zu vermeiden. Während der Hydroborierung wurde an der endständigen Doppelbindung des Alkylspacers ein α -ständiger Alkohol gebildet, der in der nachfolgenden Phosphorylierungsreaktion zum Phosphat umgesetzt wurde. Die letzte Reaktionsstufe umfasste die Entschützung des tert-Butylesters zur freien Säure und somit die Bildung der terminalen funktionellen Gruppe.

Ein Überblick über die vollständige Syntheseroute zur Darstellung der Verbindungen **COOH-EG₃-C₁₁-PO₄H₂** und **COOH-EG₃-C₁₇-PO₄H₂** wird in der nachfolgenden Abbildung 3-15 gegeben.

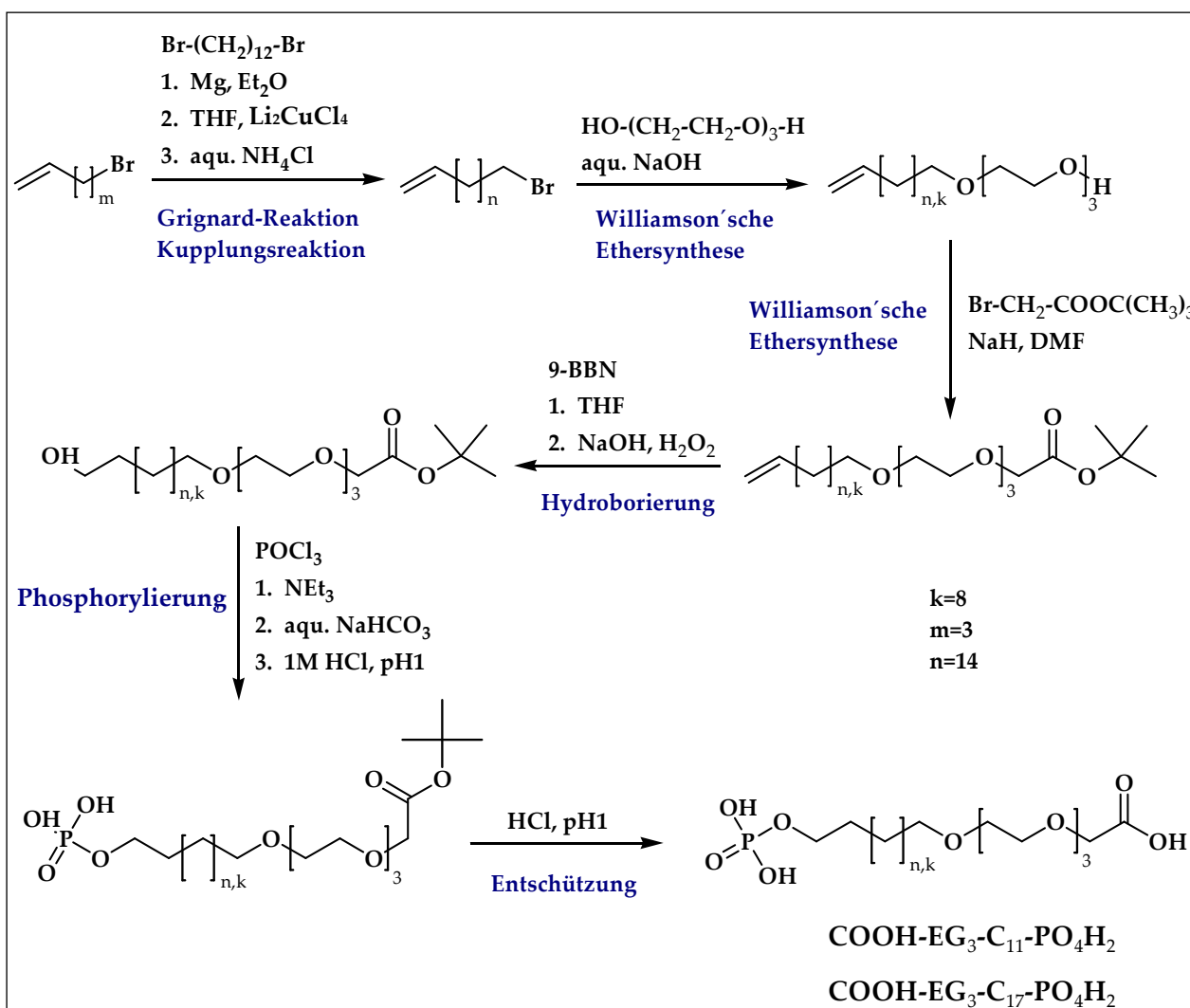


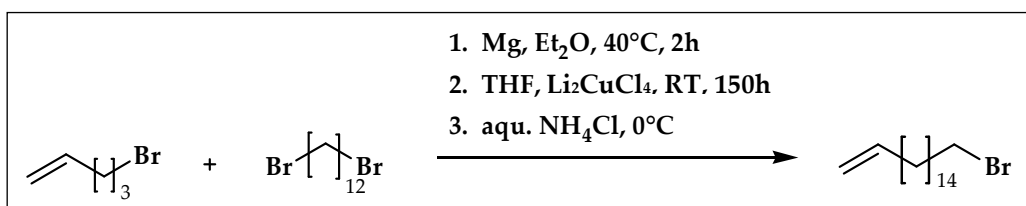
Abbildung 3-15: Reaktionsschema zur Darstellung des Phosphorsäure-mono-(22-carboxy-12,15,18,21-tetraoxadocosyl)-esters ($\text{COOH-EG}_3\text{-C}_{11}\text{-PO}_4\text{H}_2$) und des Phosphorsäure-mono-(28-carboxy-18,21,24,27-tetraoxaoctacosyl)-esters ($\text{COOH-EG}_3\text{-C}_{17}\text{-PO}_4\text{H}_2$)

3.4.1 Erste Synthesestufe: Grignard- mit anschließender Kupplungsreaktion

Darstellung von 17-Brom-1-heptadecen ($\text{Br}-(\text{CH}_2)_{15}-\text{CH}=\text{CH}_2$) [103]

Die Darstellung der Verbindung $\text{Br}-(\text{CH}_2)_{15}-\text{CH}=\text{CH}_2$ erfolgt über die Grignard-Reaktion und der anschließenden Kupplungsreaktion. Damit bei dieser Reaktion möglichst hohe Umsätze erzielt werden können, erweist es sich als notwendig, unter Argonatmosphäre sowie unter Ausschluss von Wasser zu arbeiten.

Reaktionsgleichung:



Reaktionsführung:

Darstellung des Grignard-Reagenz

Das Grignard-Reagenz kann über die Reaktion von 5-Brom-1-penten (20 mmol; 2,98 g) mit Magnesium (33 mmol; 0,80 g) in Diethylether hergestellt werden. Dazu werden zunächst die Apparatur sowie die Magnesiumspäne unter Vakuum ausgeheizt und anschließend mit Argon belüftet. Es erfolgt nun die Zugabe von trockenem Diethylether (40 ml) und zunächst wenigen Tropfen von 5-Brom-1-penten. Nachdem die Reaktion angesprungen ist, wird weiteres 5-Brom-1-penten so zu gegeben, das das Reaktionsgemisch gelinde siedet. Danach wird das Gemisch für 2h am Rückfluss erhitzt.

Kupplungsreaktion

Das Grignard-Reagenz wird über einen Tropftrichter zügig dem eisgekühlten Reaktionsgemisch aus 1,12-Dibromdodecan (40 mmol; 13,12 g) in trockenem THF (40 ml) und Li_2CuCl_4 (0,3 ml; Lösung in THF) zugegeben. Das resultierende Gemisch wird anschließend langsam auf Raumtemperatur erwärmt und rührt 150h bei dieser Temperatur. Nach Ablauf dieser Zeit erfolgt die Hydrolyse mit wässriger NH_4Cl -Lösung (30 ml, 0,1 M) unter Eiskühlung. Nach der Extraktion mit Dichlormethan werden die organischen Phasen vereint, mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung gewaschen und anschließend über MgSO_4 getrocknet. Nach der Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum wird das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel 60, Eluent: n-Hexan). Es werden 3,45 g einer semikristallinen farblosen Substanz isoliert.

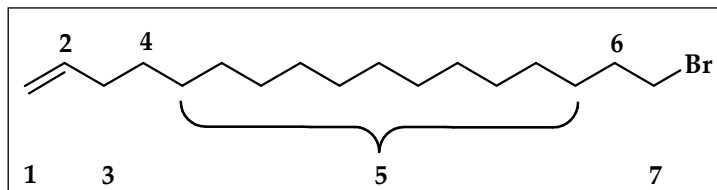
Charakterisierung:

17-Brom-1-heptadecen

Ausbeute: $\eta=69\%$ [Literatur: 66%]

Summenformel: $C_{17}H_{33}Br$

Molare Masse: 317,35 g/mol



1H -NMR (500,13 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 1,27 [m, 22H, 5-H], 1,36 [m, 2H, 4-H], 1,84 [m, 2H, 6-H], 2,02 [m, 2H, 3-H], 5,77 [m, 1H, 2-H], 4,90 [d, 1H, 1-H], 4,96 [d, 1H, 1-H], 3,39 [t, 2H, 7-H]

^{13}C -NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 29,4 [11C, 5-C], 29,7 [1C, 4-C], 32,8 [1C, 7-C], 33,7 [1C, 3-C], 34,1 [1C, 6-C], 114,1 [1C, 1-C], 139,2 [1C, 2-C]

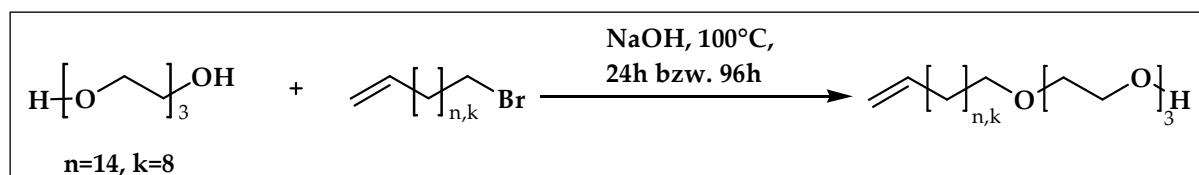
IR (KBr) ν [cm^{-1}] = 3075 ν (CH), 2925 ν_{as} (CH_2), 2855 ν_s (CH_2), 1640 ν (C=C), 1460 δ (CH), 840 ν (CH), 587 ν (C-Br)

DC: R_f = 0,69 (n-Hexan)

3.4.2 Zweite Synthesestufe: Williamson'sche Ethersynthese

Darstellung von 20-Hydroxy-(12,15,18-trioxaicos-1-en) ($H-(OCH_2-CH_2)_3-O-(CH_2)_9-CH=CH_2$) und 26-Hydroxy-(18,21,24-trioxaheptacos-1-en) ($H-(OCH_2-CH_2)_3-O-(CH_2)_{15}-CH=CH_2$) [4, 104, 105]

Reaktionsgleichung:



Reaktionsführung:

In einem ausgeheizten 100 ml Zweihalskolben werden unter Argonatmosphäre Tri(ethylenglykol) (126 mmol; 18,92 g) und wässrige Natriumhydroxidlösung (50%; 25,8 mmol; 2,04 ml) unter Eiskühlung vereint und anschließend für 1h auf 100°C erhitzt. Dem Reaktionsgemisch wird bei Raumtemperatur das entsprechende Bromalken (25,8 mmol) tropfenweise zugegeben und für weitere 24h (für k=8) bzw. 96h (für n=14) bei 100°C erhitzt.

Anschließend erfolgt eine Extraktion des Reaktionsgemisches mit n-Hexan. Die vereinigten organischen Phasen werden mit destilliertem Wasser gewaschen und anschließend über MgSO_4 getrocknet. Die Entfernung des Lösungsmittels erfolgt im Vakuum. Das resultierende Rohprodukt wird mit Hilfe der Säulenchromatographie (Kieselgel 60, Eluent: n-Hexan/Ethylacetat/Aceton 2:1:1) gereinigt und ergibt eine hellgelbe, ölige Substanz bzw. einen hellgelben Feststoff.

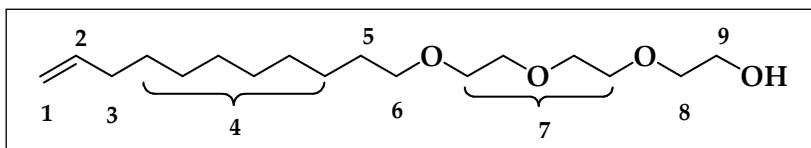
Charakterisierung:

20-Hydroxy-(12,15,18-trioxaicos-1-en)

Ausbeute: $\eta=76\%$ [Literatur: 63-78%]

Summenformel: $\text{C}_{17}\text{H}_{34}\text{O}_4$

Molare Masse: 302,45 g/mol



$^1\text{H-NMR}$ (500,13 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 1,25 [m, 12H, 4-H], 1,55 [m, 2H, 5-H], 1,96 [m, 2H, 3-H], 3,42 [t, 2H, 6-H], 3,54 [m, 8H, 7-H], 3,56 [m, 2H, 8-H], 3,70 [t, 2H, 9-H], 4,90 [d, $J=3,6$ Hz, 1H, 1-H], 4,95 [d, $J=2,13$ Hz, 1H, 1-H], 5,75 [m, $J=6,8$ Hz, 1H, 2-H]

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 26,0 [1C, 5-C], 29,4 [6C, 4-C], 33,7 [1C, 3-C], 61,7 [1C, 9-C], 69,9 [1C, 6-C], 70,5 [4C, 7-C], 72,5 [1C, 8-C], 113,9 [1C, 1-C], 139,1 [1C, 2-C]

IR (KBr) ν [cm^{-1}] = 3460 [OH], 3075 [$\text{CH}_2=\text{CH}$], 2927 $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$, 2856 $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$, 1652 $\nu(\text{C-O})$, 1638 $\nu(\text{C=C})$, 1463 $\delta(\text{CH})$, 1124 $\nu(\text{C-O})$, 842 $\nu(\text{CH})$, 753 $\delta_{\text{rocking}}(\text{CH}_2)$

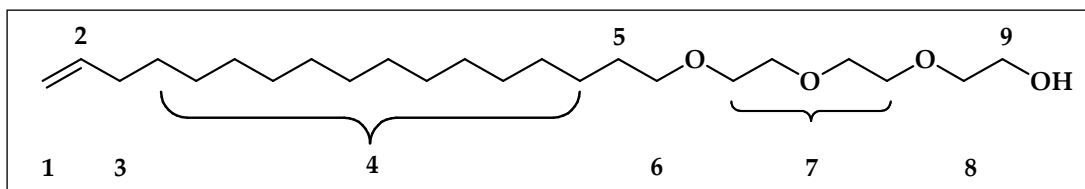
DC: $R_f=0,45$ (n-Hexan/Ethylacetat/Aceton 2:1:1)

26-Hydroxy-(18,21,24-trioxahehexacos-1-en)

Ausbeute: $\eta=64\%$ [Literatur: 63-87%]

Summenformel: $\text{C}_{23}\text{H}_{46}\text{O}_4$

Molare Masse: 386,62 g/mol



$^1\text{H-NMR}$ (500,13 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 1,25 [m, 24H, 4-H], 1,55 [m, 2H, 5-H], 1,96 [m, 2H, 3-H], 3,42 [t, 2H, 6-H], 3,54 [m, 8H, 7-H], 3,56 [m, 2H, 8-H], 3,70 [t, 2H, 9-H], 4,90 [d, $J=3,6$ Hz, 1H, 1-H], 4,95 [d, $J=2,13$ Hz, 1H, 1-H], 5,75 [m, $J=6,8$ Hz, 1H, 2-H]

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 26,0 [1C, 5-C], 29,4 [12C, 4-C], 33,7 [1C, 3-C], 61,7 [1C, 9-C], 69,9 [1C, 6-C], 70,5 [4C, 7-C], 72,5 [1C, 8-C], 113,9 [1C, 1-C], 139,1 [1C, 2-C]

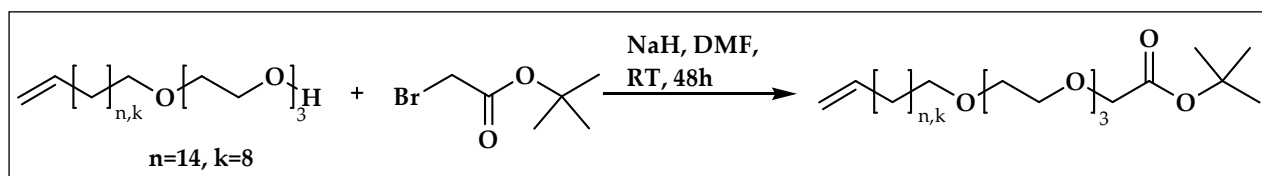
IR (KBr) ν [cm^{-1}] = 3460 $\nu(\text{OH})$, 3075 $\nu(\text{CH})$, 2928 $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$, 2857 $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$, 1651 $\nu(\text{C-O})$, 1642 $\nu(\text{C=C})$, 1460 $\delta(\text{CH})$, 1122 $\nu(\text{C-O})$, 840 $\nu(\text{CH})$, 753 $\delta_{\text{rocking}}(\text{CH}_2)$

DC: $R_f = 0,56$ (n-Hexan/Ethylacetat/Aceton 2:1:1)

3.4.3 Dritte Synthesestufe: Williamson'sche Ethersynthese

Darstellung von 12,15,18,21-Tetraoxahenicos-1-en-21-essigsäure-tert-butylester $((\text{CH}_3)_3\text{C-OOC-CH}_2\text{-(OCH}_2\text{-CH}_2)_3\text{-O-(CH}_2)_9\text{-CH=CH}_2)$ und *18,21,24,27-Tetraoxaoctacos-1-en-28-essigsäure-tert-butylester* $((\text{CH}_3)_3\text{C-OOC-CH}_2\text{-(OCH}_2\text{-CH}_2)_3\text{-O-(CH}_2)_{15}\text{-CH=CH}_2)$ [3, 6]

Reaktionsgleichung:



Reaktionsführung:

In einem ausgeheizten 250 ml Zweihalskolben werden unter Argonatmosphäre die Verbindung $\text{H-(OCH}_2\text{-CH}_2)_3\text{-O-(CH}_2)_9\text{-CH=CH}_2$ bzw. $\text{H-(OCH}_2\text{-CH}_2)_3\text{-O-(CH}_2)_{15}\text{-CH=CH}_2$ (5,6 mmol) in trockenem DMF (56 ml) gelöst und anschließend bei einer Temperatur von 0°C Natriumhydrid (60% Dispersion in Mineralöl) (11,2 mmol; 0,27 g) im Argongegenstrom portionsweise zugegeben. Das Reaktionsgemisch rührt 30min bei 0°C . Nachdem die Wasserstoffentwicklung etwas nachgelassen hat, erfolgt die langsame Zugabe von tert-Butylbromacetat (8,4 mmol; 1,64 g) ebenfalls bei einer Temperatur von 0°C . Anschließend rührt das Reaktionsgemisch für

weitere 48h bei Raumtemperatur. Zur Aufarbeitung wird das Gemisch mit Ethylacetat (100 ml) versetzt und zunächst dreimal mit destilliertem Wasser sowie Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Nach der Trocknung über MgSO_4 wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel 60, Eluent: Dichlormethan/Ethylacetat/n-Hexan 5:3:2). Es wird eine intensiv gelbe, ölige Substanz bzw. ein gelber Feststoff isoliert.

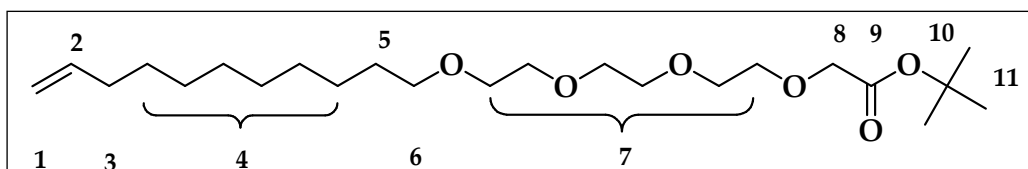
Charakterisierung:

12,15,18,21-Tetraoxahenicos-1-en-21-essigsäure-tert-butylester

Ausbeute: $\eta=82\%$ [Literatur: 71%]

Summenformel: $\text{C}_{23}\text{H}_{44}\text{O}_6$

Molare Masse: 416,60 g/mol



$^1\text{H-NMR}$ (500,13 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 1,26 [m, 12H, 4-H], 1,46 [s, 9H, 11-H], 1,55 [m, 2H, 5-H], 1,99 [m, 2H, 3-H], 3,42 [t, 2H, 6-H], 3,65 [m, 12H, 7-H], 4,0 [s, 2H, 8-H], 4,90 [d, 1H, 1-H], 4,95 [d, 1H, 1-H], 5,76 [m, 1H, 2-H]

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 26,1 [1C, 5-C], 29,1 [3C, 11-C], 29,4 [6 C, 4-C], 33,7 [1C, 3-C], 70,0 [1C, 6-C], 70,5 [6C, 7-C], 71,5 [1C, 10-C], 74,2 [1C, 8-C], 114,1 [1C, 1-C], 139,2 [1C, 2-C], 169,7 [1C, 9-C]

IR (KBr) ν [cm^{-1}] = 3075 $\nu(\text{CH})$, 2976 $\nu_{\text{as, s}}(\text{CH}_3)$, 2928 $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$, 2857 $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$, 1753 $\nu(\text{C=O})$, 1652 $\nu(\text{C-O})$, 1641 $\nu(\text{C=C})$, 1464 $\delta(\text{CH})$, 1392 $\delta_{\text{s}}(\text{C}(\text{CH}_3)_3)$, 1123 $\nu(\text{C-O})$, 843 $\nu(\text{CH})$, 751 $\delta_{\text{rocking}}(\text{CH}_2)$

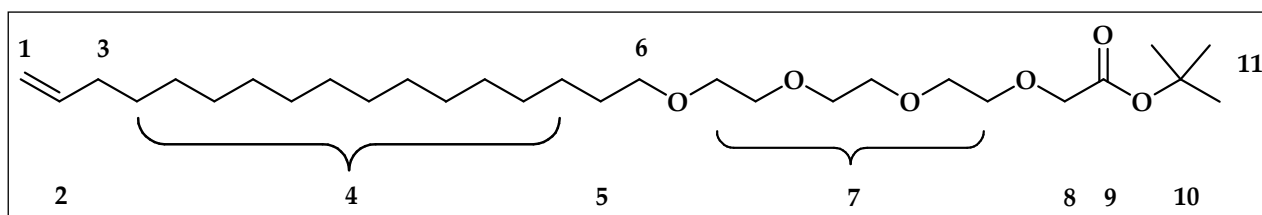
DC: $R_f = 0,61$ (Dichlormethan/Ethylacetat/n-Hexan 5:3:2)

18,21,24,27-Tetraoxaoctacos-1-en-28-essigsäure-tert-butylester

Ausbeute: $\eta=77\%$ [Literatur: 71%]

Summenformel: $\text{C}_{29}\text{H}_{56}\text{O}_6$

Molare Masse: 500,76 g/mol



$^1\text{H-NMR}$ (500,13 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 1,26 [m, 24H, 4-H], 1,46 [s, 9H, 11-H], 1,55 [m, 2H, 5-H], 1,99 [m, 2H, 3-H], 3,42 [t, 2H, 6-H], 3,65 [m, 12H, 7-H], 4,0 [s, 2H, 8-H], 4,90 [d, 1H, 1-H], 4,95 [d, 1H, 1-H], 5,76 [m, 1H, 2-H]

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 26,1 [1C, 5-C], 29,1 [3C, 11-C], 29,4 [12 C, 4-C], 33,7 [1C, 3-C], 70,0 [1C, 6-C], 70,5 [6C, 7-C], 71,5 [1C, 10-C], 74,2 [1C, 8-C], 114,1[1C, 1-C], 139,2 [1C, 2-C], 169,7 [1C, 9-C]

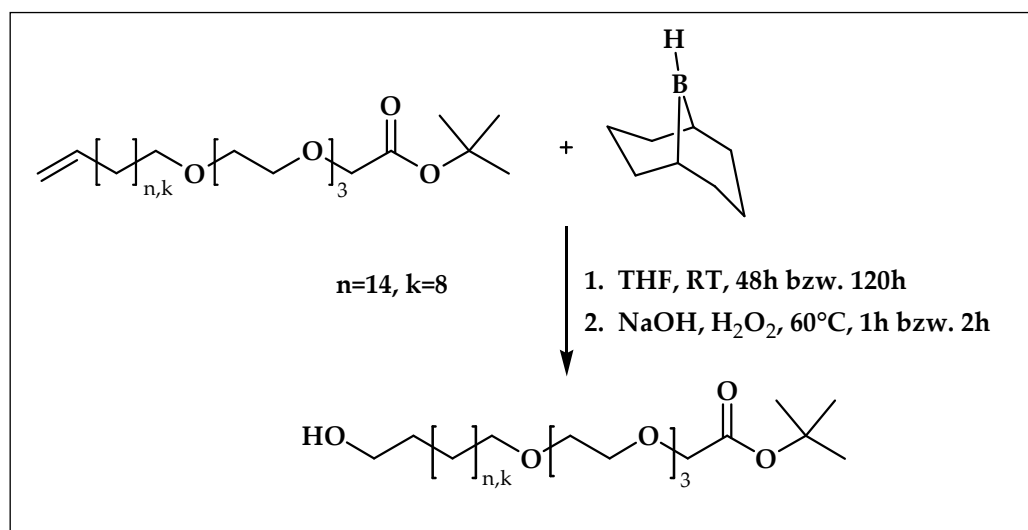
IR (KBr) ν [cm^{-1}] = 3075 $\nu(\text{CH})$, 2975 $\nu_{\text{as, s}}(\text{CH}_3)$, 2926 $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$, 2855 $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$, 1751 $\nu(\text{C=O})$, 1650 $\nu(\text{C-O})$, 1641 $\nu(\text{C=C})$, 1465 $\delta(\text{CH})$, 1395 $\delta_{\text{s}}(\text{C}(\text{CH}_3)_3)$, 1125 $\nu(\text{C-O})$, 840 $\nu(\text{CH})$, 754 $\delta_{\text{rocking}}(\text{CH}_2)$

DC: $R_f = 0,65$ (Dichlormethan/Ethylacetat/n-Hexan 5:3:2)

3.4.4 Vierte Synthesestufe: Hydroborierung

Darstellung von Hydroxy-(12,15,18,21-tetraoxahenicosyl-21-essigsäure-tert-butylester) ((CH_3)₃-C-OOC-CH₂-(OCH₂-CH₂)₃-O-(CH₂)₁₁-OH) und 1-Hydroxy-(18,21,24,27-tetraoxaheptacosyl-27-essigsäure-tert-butylester) ((CH_3)₃-C-OOC-CH₂-(OCH₂-CH₂)₃-O-(CH₂)₁₇-OH) [106]

Reaktionsgleichung:



Reaktionsführung:

In einem ausgeheizten 100 ml Dreihalskolben, versehen mit Thermometer und Rückflusskühler, wird unter Argonatmosphäre das Syntheseprodukt $(\text{CH}_3)_3\text{C-OOC-CH}_2\text{-(OCH}_2\text{-CH}_2)_3\text{-O-(CH}_2)_9\text{-CH=CH}_2$ bzw. $(\text{CH}_3)_3\text{C-OOC-CH}_2\text{-(OCH}_2\text{-CH}_2)_3\text{-O-(CH}_2)_{15}\text{-CH=CH}_2$ (7,5 mmol) in trockenem THF (45 ml) gelöst und bei 0°C eine 0,5 M 9-BBN-Lösung in THF (15,2 mmol; 30,28 ml) tropfenweise zugegeben. Das Reaktionsgemisch rührt für 48h (für k=8) bzw. 120h (für n=14) bei Raumtemperatur. Während dieser Zeit wird mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie die Präsenz der Ausgangsverbindung kontrolliert. Nach beendeter Reaktion erfolgt die Hydrolyse des Produktes durch die langsame Zugabe von 6M Natronlauge (3,8 ml) sowie Wasserstoffperoxid (30%, 3,0 ml) bei 0°C, dabei sollte die Temperatur des Reaktionsgemisches 5°C nicht übersteigen. Um eine vollständige Umsetzung zu erzielen, wird das Gemisch für 1h (für k=8) bzw. 2h (für n=14) auf 60°C erwärmt und anschließend die wässrige Phase im abgekühlten Zustand mit Kaliumcarbonat gesättigt. Die organische Phase wird über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt säulenchromatographisch. (Kieselgel 60, Eluent: n-Hexan/Ethylacetat 2:5). Es wird eine gelbe ölige Substanz bzw. ein gelber Feststoff isoliert.

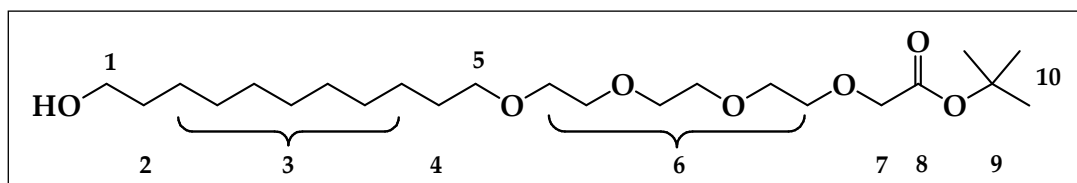
Charakterisierung:

Hydroxy-(12,15,18,21-tetraoxahenicosyl-21-essigsäure-tert-butylester)

Ausbeute: $\eta=90\%$ [Literatur: 93%]

Summenformel: $\text{C}_{23}\text{H}_{46}\text{O}_7$

Molare Masse: 434,61 g/mol



$^1\text{H-NMR}$ (500,13 MHz, CDCl_3) $\delta[\text{ppm}]$ = 1,29 [m, 14H, 3-H], 1,45 [s, 9H, 10-H], 1,49 [m, 2H, 4-H], 1,53 [m, 2H, 2-H], 3,42 [t, 2H, 5-H], 3,55 [t, 2H, 1-H], 3,64 [m, 12H, 6-H], 4,0 [s, 2H, 7-H]

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) $\delta[\text{ppm}]$ = 29,4 [3C, 10-C], 29,5 [7C, 3-C], 29,7 [1C, 4-C], 32,8 [1C, 2-C], 63,0 [1C, 1-C], 70,0 [1C, 5-C], 70,6 [6C, 6-C], 73,3 [1C, 9-C], 74,5 [1C, 7-C], 169,7 [1C, 8-C]

IR (KBr) $\nu [cm^{-1}] = 3452 \nu(OH), 2978 \nu_{as, s}(CH_3), 2929 \nu_{as}(CH_2), 2857 \nu_s(CH_2), 1753 \nu(C=O), 1654 \nu(C-O), 1461 \delta(CH), 1392 \delta_s(C(CH_3)_3), 1145-1126 \nu(C-O), 838 \nu(CH), 748 \delta_{rocking}(CH_2)$

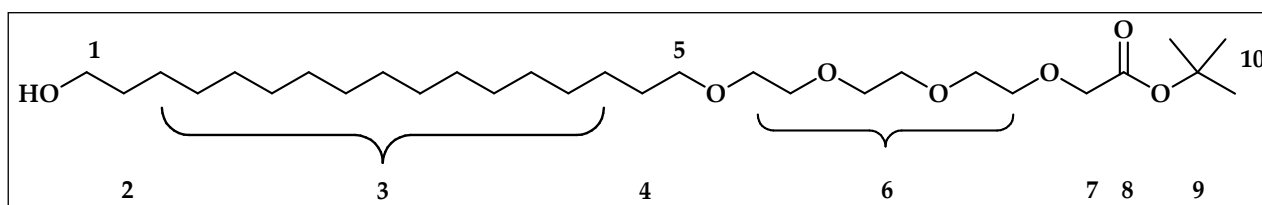
DC: $R_f = 0,43$ (n-Hexan/Ethylacetat 2:5)

Hydroxy-(18,21,24,27-tetraoxaheptacosyl-27-essigsäure-tert-butylester)

Ausbeute: $\eta = 74\%$ [Literatur: 93%]

Summenformel: $C_{29}H_{58}O_7$

Molare Masse: 518,78 g/mol



1H -NMR (500,13 MHz, $CDCl_3$) $\delta [ppm] = 1,29 [m, 26H, 3-H], 1,45 [s, 9H, 10-H], 1,49 [m, 2H, 4-H], 1,53 [m, 2H, 2-H], 3,42 [t, 2H, 5-H], 3,55 [t, 2H, 1-H], 3,64 [m, 12H, 6-H], 4,0 [s, 2H, 7-H]$

^{13}C -NMR (75 MHz, $CDCl_3$) $\delta [ppm] = 29,4 [3C, 10-C], 29,5 [13C, 3-C], 29,7 [1C, 4-C], 32,8 [1C, 2-C], 63,0 [1C, 1-C], 70,0 [1C, 5-C], 70,6 [6C, 6-C], 73,3 [1C, 9-C], 74,5 [1C, 7-C], 169,7 [1C, 8-C]$

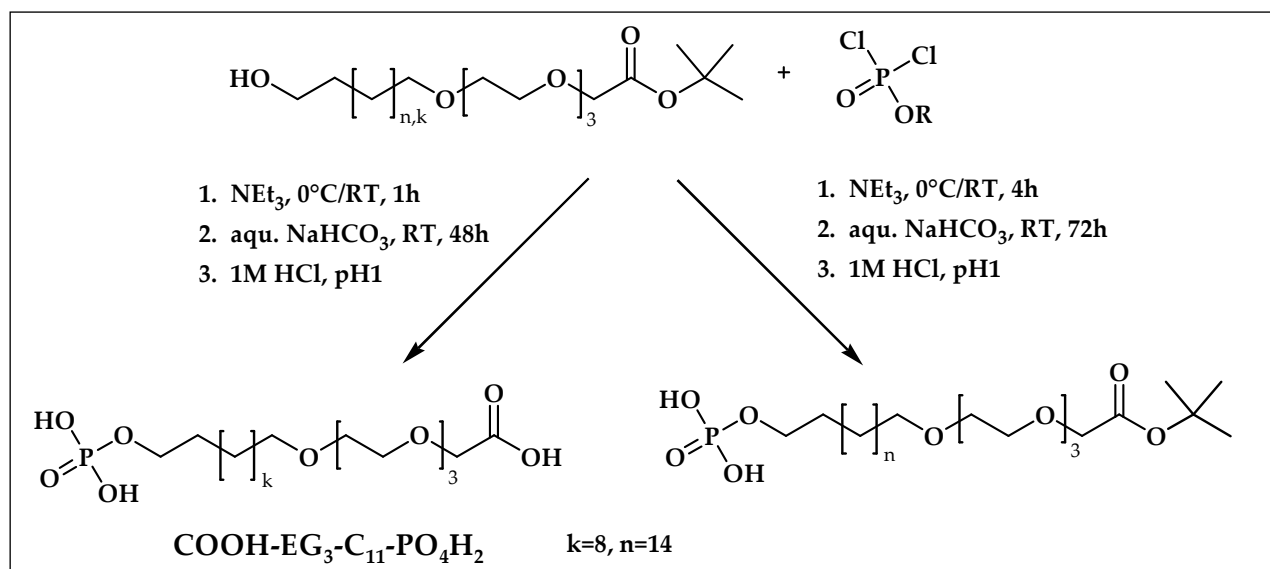
IR (KBr) $\nu [cm^{-1}] = 3453 \nu(OH), 2976 \nu_{as, s}(CH_3), 2925 \nu_{as}(CH_2), 2854 \nu_s(CH_2), 1751 \nu(C=O), 1653 \nu(C-O), 1464 \delta(CH), 1392 \delta_s(C(CH_3)_3), 1143-1125 \nu(C-O), 840 \nu(CH), 750 \delta_{rocking}(CH_2)$

DC: $R_f = 0,54$ (n-Hexan/Ethylacetat 2:5)

3.4.5 Fünfte Synthesestufe: Phosphorylierung

Darstellung von Phosphorsäure-mono-(22-carboxy-12,15,18,21-tetraoxadocosyl)-ester (COOH-EG₃-C₁₁-PO₄H₂) und Phosphorsäure-mono-(18,21,24,27-tetraoxaheptacosyl-27-essigsäure-tert-butylester) ((CH₃)₃COOC-CH₂-(OCH₂-CH₂)₃-O-(CH₂)₁₇-O-PO(OH)₂) [107]

Reaktionsgleichung:



Reaktionsführung:

In einem ausgeheizten 100 ml Dreihalskolben wird unter Argonatmosphäre Phosphoroxychlorid (4 mmol; 0,37 ml) in trockenem THF (12 ml) gelöst und auf 0°C abgekühlt. Bei dieser Temperatur erfolgt die langsame Zugabe von Triethylamin (5,1 mmol; 0,71 ml, frisch destilliert). Nach einer Reaktionszeit von 20 min bei 0°C kann die Ausbildung eines weißen Niederschlags beobachtet werden. Danach erfolgt die tropfenweise, langsame Zugabe einer Lösung aus (CH₃)₃OOC-CH₂-(OCH₂-CH₂)₃-O-(CH₂)₁₁-OH bzw. (CH₃)₃OOC-CH₂-(OCH₂-CH₂)₃-O-(CH₂)₁₇-OH (3,4 mmol) in trockenem THF (5 ml). Das resultierende Gemisch rührt nun 1h bei 0°C und 1h bzw. 4h bei Raumtemperatur. Im Anschluss wird das Reaktionsgemenge unter Eiskühlung mit einer gesättigten wässrigen Natriumhydrogencarbonat-Lösung (31 ml) versetzt und rührt für weitere 48h bzw. 72h bei Raumtemperatur. Das Gemisch wird nun mit destilliertem Wasser (35 ml) und anschließend mit 1M Salzsäure bis zu einem pH-Wert von 1 versetzt und weitere 16h unter Kontrolle des pH-Wertes bei Raumtemperatur gerührt. Das Produkt wird mit Diethylether extrahiert, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt kann mit Hilfe der Säulenchromatographie über zwei Stufen gereinigt werden (Kieselgel 60, Eluent: 1. n-Hexan/Ethylacetat/Aceton 2:1:1, 2. Methanol). Es wird eine farbloser, wachsartiger Feststoff isoliert.

Charakterisierung:

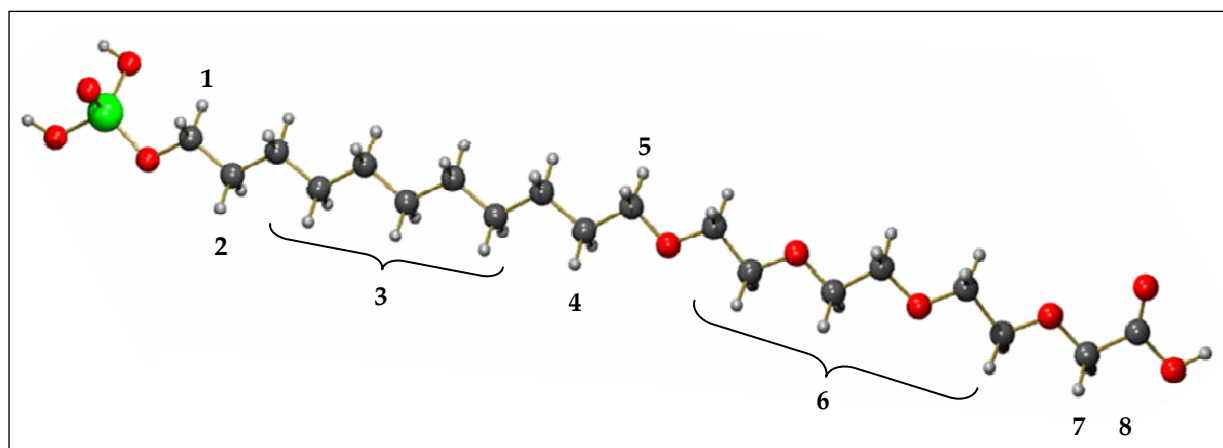
Phosphorsäure –mono-(22-carboxy-12,15,18,21-tetraoxadocosyl)-ester

$(\text{COOH-EG}_3\text{-C}_{11}\text{-PO}_4\text{H}_2)$

Ausbeute: $\eta=68\%$ [Literatur: 65%]

Summenformel: $\text{C}_{19}\text{H}_{39}\text{O}_{10}\text{P}$

Molare Masse: 458,49 g/mol



$^1\text{H-NMR}$ (500,13 MHz, CDCl_3) $\delta[\text{ppm}]$ = 1,23 [t, 14H, 3-H], 1,46 [m, 2H, 4-H], 1,49 [m, 2H, 2-H], 3,42 [m, 2H, 5-H], 3,55 [t, 2H, 1-H], 3,65 [m, 12H, 6-H], 4,01 [s, 2H, 7-H]

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) $\delta[\text{ppm}]$ = 30,4 [7C, 3-C], 30,5 [1C, 2-C], 31,7 [1C, 4-C], 69,1 [1C, 1-C], 69,9 [1C, 5-C], 70,5 [6C, 6-C], 76,7 [1C, 7-C], 171,0 [1C, 8-C]

$^{31}\text{P-NMR}$ (202,47MHz, CDCl_3) $\delta[\text{ppm}]$ = 2,1

IR (KBr) $\nu[\text{cm}^{-1}]$ = 3453 $\nu(\text{OH})$, 2927 $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$, 2855 $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$, 2742 $\nu(\text{P-OH})$, 1741 $\nu(\text{C=O})$, 1652 $\nu(\text{C-O})$, 1468 $\delta(\text{CH})$, 1223 $\nu(\text{P=O})$, 1167 $\nu_{\text{as}}(\text{P-O-C})$, 1140-1115 $\nu(\text{C-O})$, 1057 $\nu(\text{P-OH})$, 1042-980 $\nu_{\text{s}}(\text{P-O-C})$, 995-945 $\nu_{\text{s}}(\text{R-O-PO}_3^{2-})$, 857 $\delta_{\text{rocking}}(\text{CH}_2)$

DC: $R_f = 0$ (n-Hexan/Ethylacetat/Aceton 2:1:1)

Elementaranalyse [%]: theoretisch: C: 49,77; H: 8,57 experimentell: C: 49,72; H: 8,63

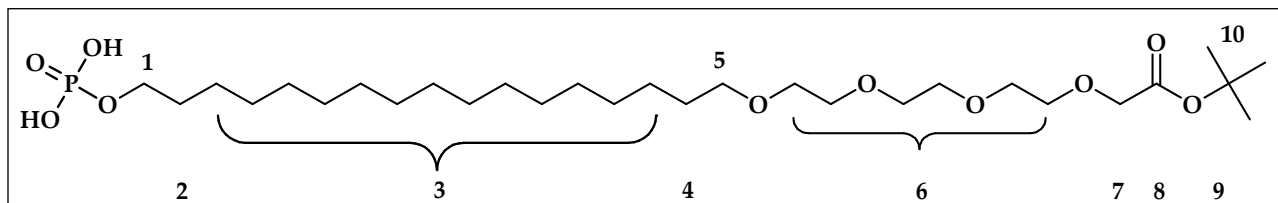
Schmelzpunkt: 68°C

Phosphorsäure –mono-(18,21,24,27-tetraoxaheptacosyl-27-essigsäure-tert-butylester)

Ausbeute: $\eta=67\%$ [Literatur: 65%]

Summenformel: $C_{29}H_{59}O_{10}P$

Molare Masse: 598,76 g/mol



$^1\text{H-NMR}$ (500,13 MHz, CDCl_3) $\delta[\text{ppm}] = 1,24$ [t, 26H, 3-H], 1,46 [s, 9H, 10-H], 1,55 [m, 2H, 4-H], 1,56 [m, 2H, 2-H], 3,45 [t, 2H, 5-H], 3,58 [t, 2H, 1-H], 3,67 [m, 12H, 6-H], 4,01 [s, 2H, 7-H]

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) $\delta[\text{ppm}] = 28,1$ [3C, 10-C], 29,4 [7C, 3-C], 29,5 [1C, 2-C], 31,7 [1C, 4-C], 68,9 [1C, 1-C], 70,5 [1C, 5-C], 71,6 [6C, 6-C], 72,4 [1C, 7-C], 169,8 [1C, 8-C]

$^{31}\text{P-NMR}$ (202,47MHz, CDCl_3) $\delta[\text{ppm}] = 1,91$

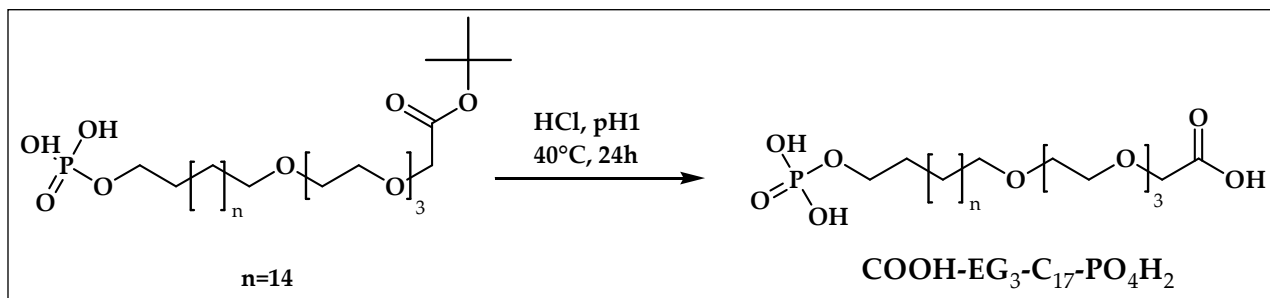
IR (KBr) $\nu[\text{cm}^{-1}] = 2973$ ν_{as} , $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_3)$, 2928 $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$, 2852 $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$, 2743 $\nu(\text{P-OH})$, 1747 $\nu(\text{C=O})$, 1651 $\nu(\text{C-O})$, 1468 $\delta(\text{CH})$, 1249 $\nu(\text{P=O})$, 1395 $\delta_{\text{s}}(\text{C}(\text{CH}_3)_3)$, 1165 $\nu_{\text{as}}(\text{P-O-C})$, 1140-1115 $\nu(\text{C-O})$, 1055 $\nu(\text{P-OH})$, 1042-948 $\nu_{\text{s}}(\text{P-O-C})$, 995-949 $\nu_{\text{s}}(\text{R-O-PO}_3^{2-})$, 855 $\delta_{\text{rocking}}(\text{CH}_2)$

DC: $R_f = 0$ (n-Hexan/Ethylacetat/Aceton 2:1:1)

3.4.6 Sechste Synthesestufe: Entschützungsreaktion

Darstellung von Phosphorsäure-mono-(28-carboxy-18,21,24,27-tetraoxaoctacosyl)-ester
($\text{COOH-EG}_3\text{-C}_{17}\text{-PO}_4\text{H}_2$) [107]

Reaktionsgleichung:

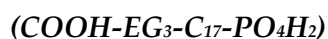


Reaktionsführung:

In einem 50 ml Zweihalskolben wird die Substanz $(\text{CH}_3)_3\text{OOC-CH}_2\text{-(OCH}_2\text{-CH}_2)_3\text{-O-(CH}_2)_{17}\text{-O-PO(OH)}_2$ (1,2 mmol, 0,7 g) in Ethanol (15 ml) gelöst und anschließend Wasser (15 ml) zugegeben. Das Gemisch wird unter Eiskühlung mit 1M Salzsäure bis pH1 angesäuert und rührt nun 24h bei 40°C. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der entstandene getrocknete, farblose Feststoff in einem Gemisch aus n-Hexan/Ethylacetat im Verhältnis 1:1 umkristallisiert. Es resultiert eine farblose, kristalline Substanz.

Charakterisierung:

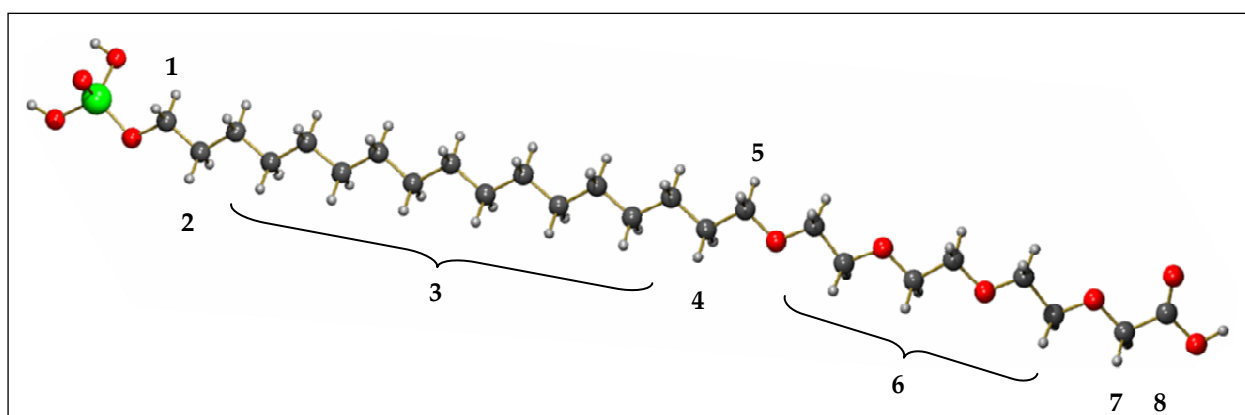
Phosphorsäure-mono-(28-carboxy-18,21,24,27-tetraoxaoctacosyl)-ester



Ausbeute: $\eta=94,5\%$

Summenformel: $\text{C}_{25}\text{H}_{51}\text{O}_{10}\text{P}$

Molare Masse: 542,65 g/mol



$^1\text{H-NMR}$ (500,13 MHz, CDCl_3) $\delta[\text{ppm}] = 1,24$ [t, 26H, 3-H], 1,55 [m, 2H, 4-H], 1,56 [m, 2H, 2-H], 3,45 [t, 2H, 5-H], 3,58 [t, 2H, 1-H], 3,67 [m, 12H, 6-H], 4,01 [s, 2H, 7-H]

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) $\delta[\text{ppm}] = 29,4$ [13C, 3-C], 29,5 [1C, 2-C], 31,7 [1C, 4-C], 68,9 [1C, 1-C], 70,4 [1C, 5-C], 71,5 [6C, 6-C], 72,4 [1C, 7-C], 175,8 [1C, 8-C]

$^{31}\text{P-NMR}$ (202,47MHz, CDCl_3) $\delta[\text{ppm}] = 1,94$

IR (KBr) $\nu[\text{cm}^{-1}] = 3384$ $\nu(\text{OH})$, 2927 $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$, 2853 $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$, 2741 $\nu(\text{P-OH})$, 1743 $\nu(\text{C=O})$, 1652 $\nu(\text{C-O})$, 1468 $\delta(\text{CH})$, 1249 $\nu(\text{P=O})$, 1168 $\nu_{\text{as}}(\text{P-O-C})$, 1143-1118 $\nu(\text{C-O})$, 1065 $\nu(\text{PO})$, 1054 $\nu(\text{P-OH})$, 1042-952 $\nu_{\text{s}}(\text{P-O-C})$, 995-950 $\nu_{\text{s}}(\text{R-O-PO}_3^{2-})$, 856 $\delta_{\text{rocking}}(\text{CH}_2)$

DC: $R_f = 0$ (n-Hexan/Ethylacetat/Aceton 2:1:1)

Elementaranalyse [%]: theoretisch: C: 55,29; H: 9,40 experimentell: C: 55,27; H: 9,52

Schmelzpunkt: 64°C

3.5 Synthese von carboxylterminierten Tri(ethylenglykol)-alkylphosphonsäuren

Die Einführung einer Phosphonatgruppe als oberflächenaktive Kopfgruppe stellte neben der Verlängerung des Alkylspacers eine weitere Modifikation im Strukturkonzept des SA-Moleküls dar, um die Stabilität der Adsorbate auf metalloxidischen Oberflächen zu erhöhen.

Die Verbindungen **COOH-EG₃-C₁₁-PO₃H₂** und **COOH-EG₃-C₁₇-PO₃H₂** wurden über Mehrstufensynthesen dargestellt. Die erste Reaktionsstufe diente zum Aufbau des Alkylspacers der Verbindung **COOH-EG₃-C₁₇-PO₃H₂**. Die Ausgangssubstanz 17-Brom-1-heptadecen wurde über eine Grignard-Reaktion mit einer anschließenden Kupplungsreaktion erhalten. Die nachfolgenden beiden Reaktionsstufen beschreiben nucleophile Substitutionsreaktionen, die nach dem Mechanismus einer Williamson'schen Ethersynthese verliefen. Ausgehend vom Tri(ethylenglykol) wurde zunächst der Alkylspacer eingeführt und im anschließenden Reaktionsschritt die geschützte funktionelle Gruppe, der tert-Butylester an das Tri(ethylenglykol), substituiert. Die Hydroborierungsreaktion diente der Umsetzung der endständigen Doppelbindung des Alkylspacers in einen endständigen Alkohol. Die Hydroxygruppe konnte nun in der nachfolgenden Finkelstein-Reaktion über das Tosylat zum Bromid umgesetzt werden. Das α -ständige Bromid reagierte in der Michaelis-Arbuzov-Reaktion mit *tris*-Trimethylsilylphosphit und anschließender Hydrolyse zur Phosphonsäure. Die letzte Reaktionsstufe umfasste die Entschützung des tert-Butylesters zur freien Säure und somit die Bildung der terminalen funktionellen Gruppe.

Ein Überblick über die vollständige Syntheseroute zur Darstellung der Verbindungen **COOH-EG₃-C₁₁-PO₃H₂** und **COOH-EG₃-C₁₇-PO₃H₂** wird in der nachfolgenden Abbildung 3-16 gegeben.

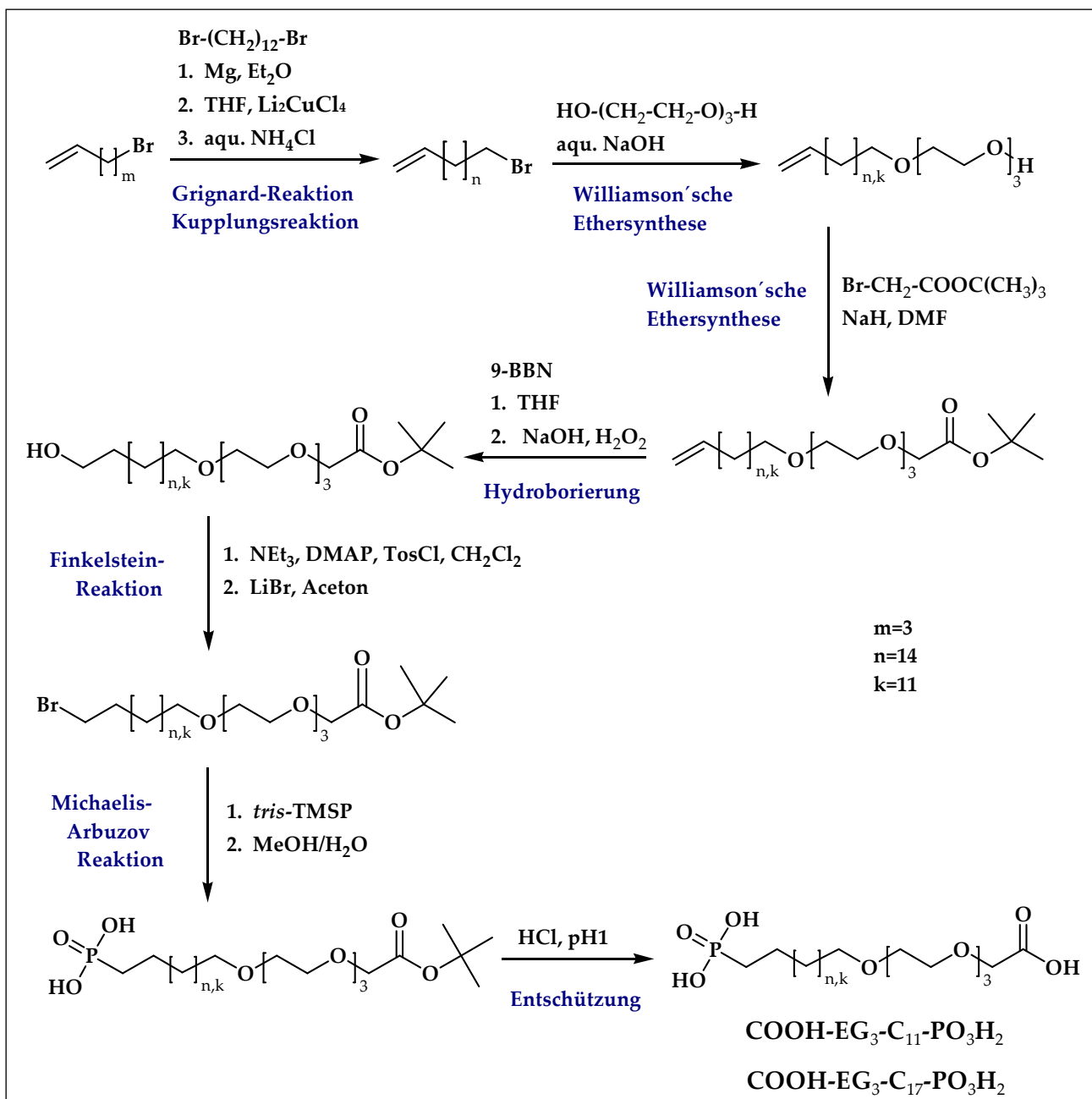


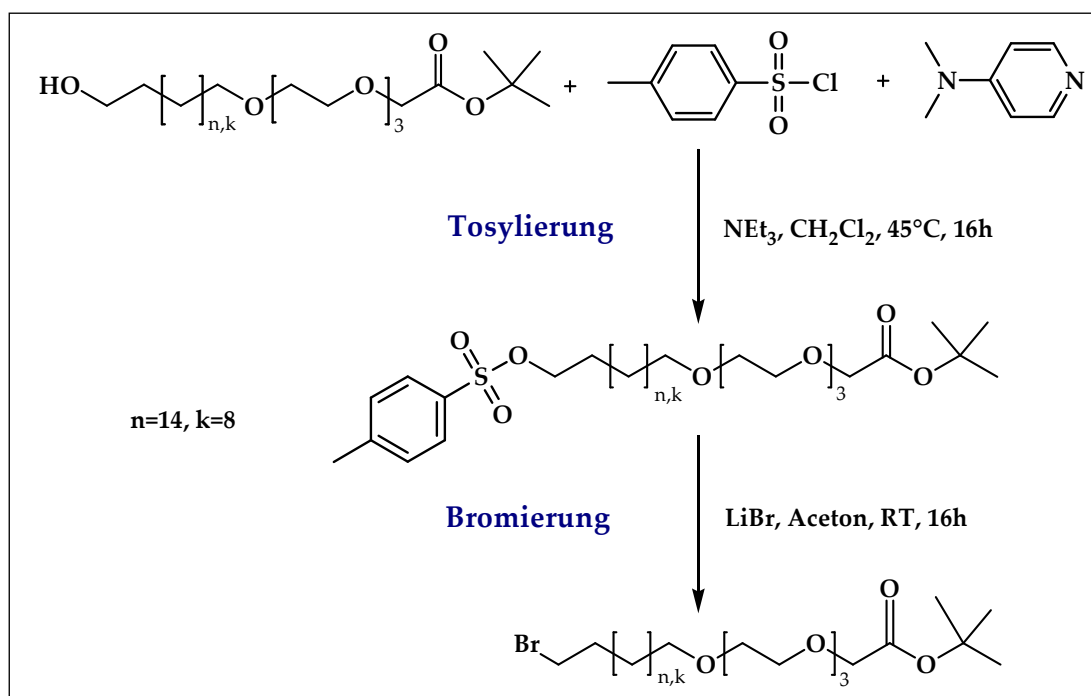
Abbildung 3-16: Reaktionsschema zur Darstellung des 22-Carboxy-(12,15,18,21-tetraoxadocosyl)-phosphonsäure ($\text{COOH-EG}_3\text{-C}_{11}\text{-PO}_3\text{H}_2$) und des 28-Carboxy-(18,21,24,27-tetraoxa-octacosyl)-phosphonsäure ($\text{COOH-EG}_3\text{-C}_{17}\text{-PO}_3\text{H}_2$)

Die zur Darstellung der Verbindungen $\text{COOH-EG}_3\text{-C}_{11}\text{-PO}_3\text{H}_2$ und $\text{COOH-EG}_3\text{-C}_{17}\text{-PO}_3\text{H}_2$ benötigten ersten vier Synthesestufen wurden hinsichtlich ihrer Reaktionsgleichungen, Reaktionsführungen sowie Charakterisierungsdaten bereits unter Kapitel 3.4.1 – 3.4.4 detailliert beschrieben.

3.5.1 Fünfte Synthesestufe: Finkelstein-Reaktion

Darstellung von Brom-(12,15,18,21-tetraoxahenicoyl-21-essigsäure-tert-butylester) $((\text{CH}_3)_3\text{C}-\text{OOC}-\text{CH}_2-(\text{OCH}_2-\text{CH}_2)_3-\text{O}-(\text{CH}_2)_{11}-\text{Br})$ und Brom-(18,21,24,27-tetraoxaheptacosyl-27-essigsäure-tert-butylester) $((\text{CH}_3)_3\text{C}-\text{OOC}-\text{CH}_2-(\text{OCH}_2-\text{CH}_2)_3-\text{O}-(\text{CH}_2)_{17}-\text{Br})$ [101]

Reaktionsgleichung:



Reaktionsführung:

Tosylierung

In einem 50 ml Zweihalskolben wird unter Argonatmosphäre die Verbindung $(\text{CH}_3)_3\text{C}-\text{OOC}-\text{CH}_2-(\text{OCH}_2-\text{CH}_2)_3-\text{O}-(\text{CH}_2)_{11}-\text{OH}$ bzw. $(\text{CH}_3)_3\text{C}-\text{OOC}-\text{CH}_2-(\text{OCH}_2-\text{CH}_2)_3-\text{O}-(\text{CH}_2)_{17}-\text{OH}$ (3,3 mmol) vorgelegt und in 10 ml trockenen, frisch destillierten Dichlormethan gelöst. Dazu wird zügig ein Gemisch aus Triethylamin (4,29 mmol, 0,44 g) und DMAP (0,13 mol%, 0,053g) gelöst in 5 ml Dichlormethan zugegeben. Unter Eiskühlung wird Tosylchlorid (4,29 mmol, 0,83g) gelöst in 10 ml Dichlormethan langsam zugetropft und anschließend für 16h bei 45°C gerührt. Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch mit Wasser extrahiert, im Anschluss die organische Phase über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das resultierende Rohprodukt wird ohne weitere Reinigungsmaßnahmen sofort im nächsten Reaktionsschritt, der Bromierung eingesetzt.

Bromierung

Das Produkt der Tosylierungsreaktion wird in 50 ml destilliertem Aceton aufgenommen, anschließend erfolgt unter Eiskühlung die portionsweise Zugabe von Lithiumbromid (16,5 mmol, 1,45 g). Das Reaktionsgemisch rührt 16h bei Raumtemperatur. Nach Ablauf der Reaktionszeit erfolgt bei 0°C die Zugabe von 100 ml Wasser sowie eine anschließende Extraktion mit Dichlormethan. Die vereinten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel 60, Eluent: n-Hexan/Ethylacetat 2:1).

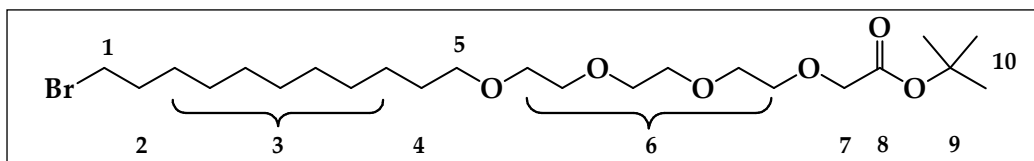
Charakterisierung:

Brom-(12,15,18,21-tetraoxahenicosyl-21-essigsäure-tert-butylester)

Ausbeute: η =65% [Literatur: 52%]

Summenformel: C₂₃H₄₅O₆Br

Molare Masse: 497,51 g/mol



¹H-NMR (500,13 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 1,28 [m, 14H, 3-H], 1,46 [s, 9H, 10-H], 1,49 [m, 2H, 4-H], 1,83 [m, 2H, 2-H], 3,43 [t, 2H, 5-H], 3,39 [t, 2H, 1-H], 3,64 [m, 12H, 6-H], 4,02 [s, 2H, 7-H]

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ [ppm]= 29,4 [3C, 10-C], 29,5 [7C, 3-C], 29,7 [1C, 4-C], 32,8 [1C, 1-C], 34,1 [1C, 2-C], 70,0 [1C, 5-C], 70,6 [6C, 6-C], 73,3 [1C, 9-C], 74,5 [1C, 7-C], 169,7 [1C, 8-C]

IR (KBr) ν [cm⁻¹] = 2973 $\nu_{as, s}$ (CH₃), 2925 ν_{as} (CH₂), 2853 ν_s (CH₂), 1749 ν (C=O), 1647 ν (C-O), 1462 δ (CH), 1393 δ_s (C(CH₃)₃), 1147-1125 ν (C-O), 1116 ν (C-O), 841 $\delta_{rocking}$ (CH₂), 585 ν (C-Br)

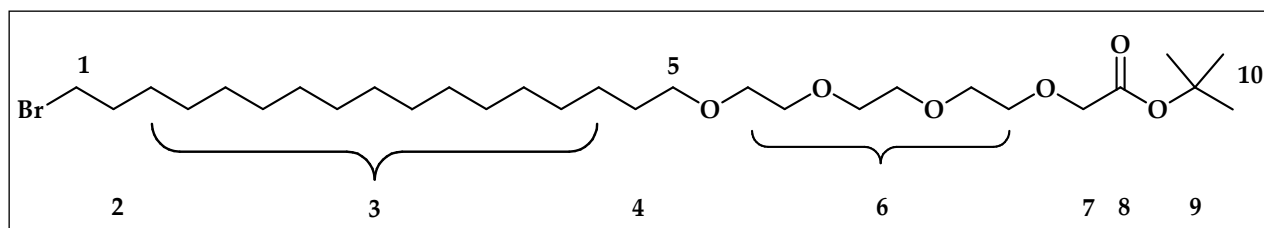
DC: R_f = 0,53 (n-Hexan/Ethylacetat 2:1)

Brom-(18,21,24,27-tetraoxaheptacosyl-27-essigsäure-tert-butylester)

Ausbeute: η =67% [Literatur: 52%]

Summenformel: C₂₉H₅₇O₆Br

Molare Masse: 581,67 g/mol



$^1\text{H-NMR}$ (500,13 MHz, CDCl_3) $\delta[\text{ppm}] = 1,29$ [m, 26H, 3-H], 1,46 [s, 9H, 10-H], 1,49 [m, 2H, 4-H], 1,83 [m, 2H, 2-H], 3,43 [t, 2H, 5-H], 3,39 [t, 2H, 1-H], 3,64 [m, 12H, 6-H], 4,02 [s, 2H, 7-H]

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) $\delta[\text{ppm}] = 29,4$ [3C, 10-C], 29,5 [13C, 3-C], 29,7 [1C, 4-C], 32,8 [1C, 1-C], 34,1 [1C, 2-C], 70,0 [1C, 5-C], 70,6 [6C, 6-C], 73,3 [1C, 9-C], 74,5 [1C, 7-C], 169,7 [1C, 8-C]

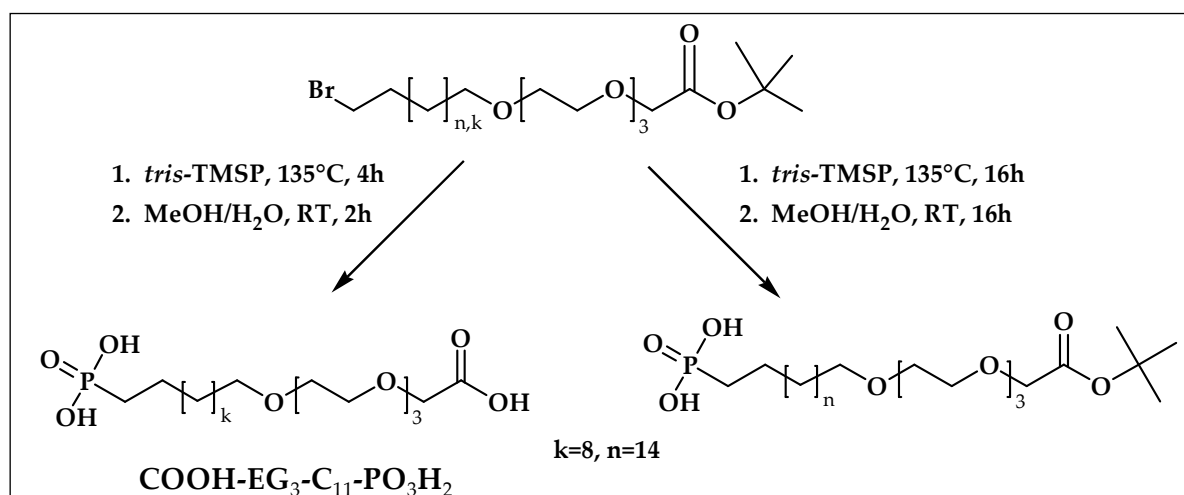
IR (KBr) $\nu[\text{cm}^{-1}] = 2973$ $\nu_{\text{as, s}}(\text{CH}_3)$, 2926 $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$, 2854 $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$, 1753 $\nu(\text{C}=\text{O})$, 1651 $\nu(\text{C}-\text{O})$, 1465 $\delta(\text{CH})$, 1392-1371 $\delta_{\text{s}}(\text{C}(\text{CH}_3)_3)$, 1147-1123 $\nu(\text{C}-\text{O})$, 1112 $\nu(\text{C}-\text{O})$, 844 $\delta_{\text{rocking}}(\text{CH}_2)$, 587 $\nu(\text{C}-\text{Br})$

DC: $R_f = 0,58$ (n-Hexan/Ethylacetat 2:1)

3.5.2 Sechste Synthesestufe: Michaelis-Arbuzov-Reaktion

Darstellung von 22-Carboxy-(12,15,18,21-tetraoxadocosyl)-phosphonsäure ($\text{COOH-EG}_3\text{-C}_{11}\text{-PO}_3\text{H}_2$) und Phosphonsäure-mono-(18,21,24,27-tetraoxaheptacosyl-27-essigsäure-tert-butylester) ($(\text{CH}_3)_3\text{-C-OOC-CH}_2\text{-(OCH}_2\text{-CH}_2)_3\text{-O-(CH}_2)_{17}\text{-PO}_3\text{H}_2$) [108, 109]

Reaktionsgleichung:



Reaktionsführung:

Die Verbindung $(\text{CH}_3)_3\text{-C-OOC-CH}_2\text{-(OCH}_2\text{-CH}_2)_3\text{-O-(CH}_2)_{11}\text{-Br}$ bzw. $(\text{CH}_3)_3\text{-C-OOC-CH}_2\text{-(OCH}_2\text{-CH}_2)_3\text{-O-(CH}_2)_{17}\text{-Br}$ (1,74 mmol) wird in einem 50 ml Zweihalskolben vorgelegt und

unter Argonatmosphäre *tris*-Trimethylsilylphosphit (6,96 mmol, 2,98 g) zugetropft. Das Gemisch wird auf 135°C erhitzt und rührt 4h (für k=8) bzw. 16h (für n=14) bei dieser Temperatur. Der Reaktionsfortschritt kann mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie dokumentiert werden. Bei Bedarf erfolgt eine weitere Zugabe an *tris*-Trimethylsilylphosphit (1 mmol, 0,46g). Nach einer vollständigen Umsetzung des Edukts erfolgt bei einer Temperatur von 0°C die Hydrolyse des Ansatzes mit einem Gemisch aus Methanol/Wasser (20 ml, im Verhältnis 1:1). Das Reaktionsgemenge rührt anschließend 2h (für k=8) bzw. 16h (für n=14) bei Raumtemperatur. Während dieser Zeit ist die Bildung eines weißen Niederschlags zu beobachten. Das Hydrolysemittel wird unter Vakuum entfernt und der resultierende Feststoff, das Phosphonsäurederivat, erneut in Ethylacetat (20 ml) aufgenommen. Die organische Phase wird nun mit Wasser und Natriumchloridlösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt kann zur Reinigung aus einem n-Hexan/Ethylacetat Gemisch im Verhältnis 1:1 umkristallisiert werden. Es resultiert ein farbloses, kristallines Produkt.

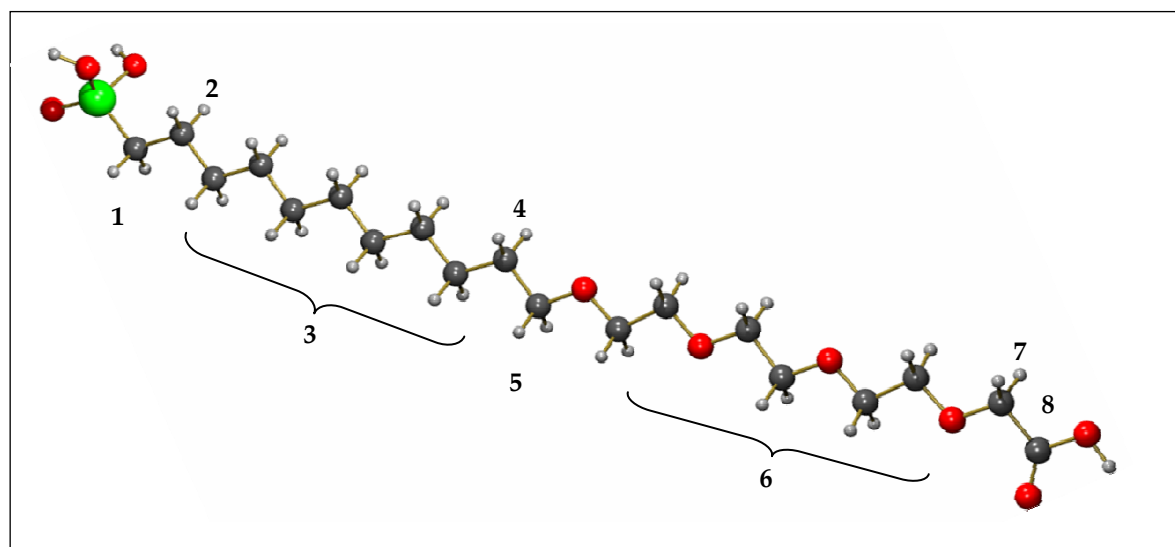
Charakterisierung:

22-Carboxy-(12,15,18,21-tetraoxadocosyl)-monophosphonsäure
(COOH-EG₃-C₁₁-PO₃H₂)

Ausbeute: η =92% [Literatur: 81%]

Summenformel: C₁₉H₃₉O₉P

Molare Masse: 442,49 g/mol



$^1\text{H-NMR}$ (500,13 MHz, MeOD) $\delta[\text{ppm}] = 1,37 [\text{m}, 14\text{H}, 3\text{-H}], 1,47 [\text{m}, 4\text{H}, 1\text{-H und } 2\text{-H}], 1,62 [\text{m}, 2\text{H}, 4\text{-H}], 3,53 [\text{m}, 2\text{H}, 5\text{-H}], 3,69 [\text{m}, 12\text{H}, 6\text{-H}], 4,2 [\text{s}, 2\text{H}, 7\text{-H}]$

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, MeOD) $\delta[\text{ppm}] = 23,9 [1\text{C}, 2\text{-C}], 30,3 [1\text{C}, 1\text{-C}], 30,5 [7\text{C}, 3\text{-C}], 30,7 [1\text{C}, 4\text{-C}], 69,1 [1\text{C}, 5\text{-C}], 71,5 [6\text{C}, 6\text{-C}], 74,5 [1\text{C}, 7\text{-C}], 172,8 [1\text{C}, 8\text{-C}]$

$^{31}\text{P-NMR}$ (202,47MHz, MeOD) $\delta[\text{ppm}] = 30,35$

IR (KBr) $\nu[\text{cm}^{-1}] = 3451 \nu(\text{OH}), 2927 \nu_{\text{as}}(\text{CH}_2), 2855 \nu_{\text{s}}(\text{CH}_2), 2740 \nu(\text{P-OH}), 1742 \nu(\text{C=O}), 1645 \nu(\text{C-O}), 1468 \delta(\text{CH}), 1215 \nu(\text{P=O}), 1143\text{-}1123 \nu(\text{C-O}), 1064 \nu_{\text{as}}(\text{PO}_3^{2-}), 1057 \nu(\text{P-OH}), 961 \nu_{\text{s}}(\text{P-O}_3^{2-}), 857 \delta_{\text{rocking}}(\text{CH}_2)$

DC: $R_f = 0$ (n-Hexan/Ethylacetat 2:1)

Elementaranalyse [%]: theoretisch: C: 51,57; H: 8,88 experimentell: C: 51,38; H: 8,97

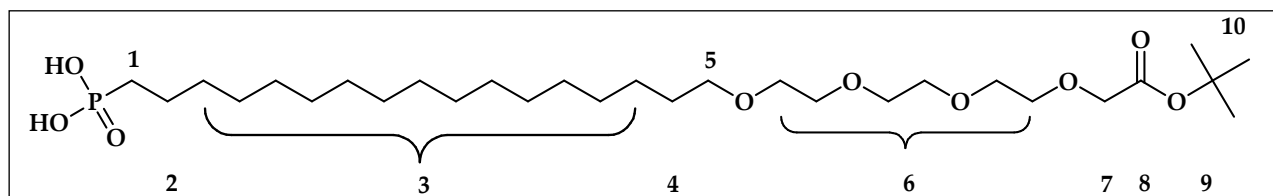
Schmelzpunkt: 76°C

Phosphonsäure-mono-(18,21,24,27-tetraoxaheptacosyl-27-essigsäure-tert-butylester)

Ausbeute: $\eta = 81\%$ [Literatur: 81%]

Summenformel: $\text{C}_{29}\text{H}_{59}\text{O}_9\text{P}$

Molare Masse: 582,76 g/mol



$^1\text{H-NMR}$ (500,13 MHz, MeOD) $\delta[\text{ppm}] = 1,36 [\text{m}, 26\text{H}, 3\text{-H}], 1,48 [\text{m}, 4\text{H}, 1\text{-H und } 2\text{-H}], 1,55 [\text{s}, 9\text{H}, 10\text{-H}], 1,63 [\text{m}, 2\text{H}, 4\text{-H}], 3,54 [\text{m}, 2\text{H}, 5\text{-H}], 3,71 [\text{m}, 12\text{H}, 6\text{-H}], 4,1 [\text{s}, 2\text{H}, 7\text{-H}]$

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, MeOD) $\delta[\text{ppm}] = 28,4 [3\text{C}, 10\text{-C}], 30,5 [13\text{C}, 3\text{-C}], 30,7 [1\text{C}, 4\text{-C}], 30,3 [1\text{C}, 1\text{-C}], 23,9 [1\text{C}, 2\text{-C}], 69,8 [1\text{C}, 5\text{-C}], 71,5 [6\text{C}, 6\text{-C}], 72,4 [1\text{C}, 9\text{-C}], 74,5 [1\text{C}, 7\text{-C}], 171,6 [1\text{C}, 8\text{-C}]$

$^{31}\text{P-NMR}$ (202,47MHz, MeOD) $\delta[\text{ppm}] = 30,28$

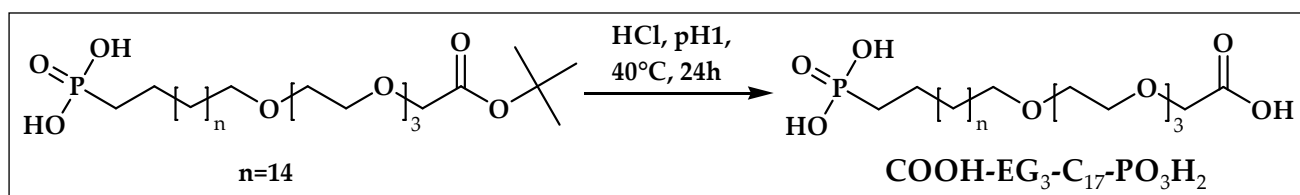
IR (KBr) $\nu[\text{cm}^{-1}] = 2977 \nu_{\text{as}}, \nu_{\text{s}}(\text{CH}_3), 2926 \nu_{\text{as}}(\text{CH}_2), 2854 \nu_{\text{s}}(\text{CH}_2), 2743 \nu(\text{P-OH}), 1747 \nu(\text{C=O}), 1653 \nu(\text{C-O}), 1462 \delta(\text{CH}), 1391 \delta_{\text{s}}(\text{C}(\text{CH}_3)_3), 1211 \nu(\text{P=O}), 1145\text{-}1125 \nu(\text{C-O}), 1067 \nu_{\text{as}}(\text{PO}_3^{2-}), 1056 \nu(\text{P-OH}), 965 \nu_{\text{s}}(\text{P-O}_3^{2-}), 844 \delta_{\text{rocking}}(\text{CH}_2)$

DC: $R_f = 0$ (n-Hexan/Ethylacetat 2:1)

3.5.3 Siebente Synthesestufe: Entschützungsreaktion

Darstellung der 28-Carboxy-(18,21,24,27-tetraoxaoctacosyl)-monophosphonsäure (COOH-EG₃-C₁₇-PO₃H₂) [107]

Reaktionsgleichung:



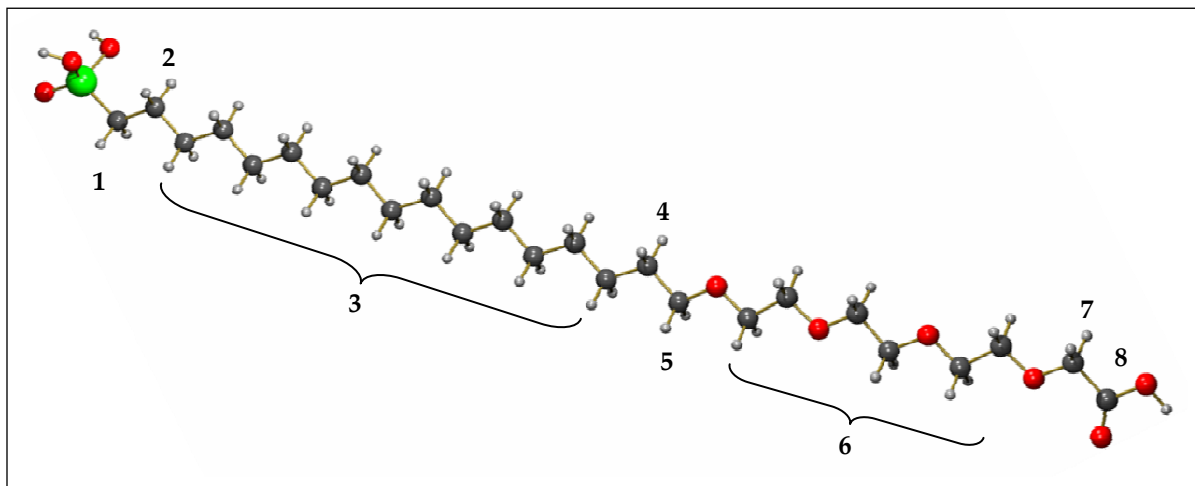
Reaktionsführung:

In einem 50 ml Zweihalskolben wird die Substanz $(\text{CH}_3)_3\text{OOC-CH}_2\text{-(OCH}_2\text{-CH}_2)_3\text{-O-(CH}_2)_{17}\text{-PO}_3\text{H}_2$ (0,86 mmol, 0,5g) zunächst in 10 ml Ethanol gelöst und anschließend 10 ml Wasser zugegeben. Das Gemisch wird unter Eiskühlung mit 1M Salzsäure bis pH1 angesäuert und rührt nun 24h bei 40°C. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der entstandene getrocknete, farblose Feststoff in einem Gemisch aus n-Hexan/Ethylacetat im Verhältnis 1:1 umkristallisiert. Es resultiert eine farblose, kristalline Substanz.

Charakterisierung:

28-Carboxy-(18,21,24,27-tetraoxaoctacosyl)-phosphonsäure
(COOH-EG₃-C₁₇-PO₃H₂)

Ausbeute: $\eta=93\%$
Summenformel: C₂₅H₅₁O₉P
Molare Masse: 526,65 g/mol



$^1\text{H-NMR}$ (500,13 MHz, MeOD) $\delta[\text{ppm}] = 1,36$ [m, 26H, 3-H], 1,47 [m, 4H, 1-H und 2-H], 1,62 [m, 2H, 4-H], 3,54 [m, 2H, 5-H], 3,69 [m, 12H, 6-H], 4,25 [s, 2H, 7-H]

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, MeOD) $\delta[\text{ppm}] = 23,9$ [1C, 2-C], 30,3 [1C, 1-C], 30,5 [13C, 3-C], 30,7 [1C, 4-C], 69,1 [1C, 5-C], 71,5 [6C, 6-C], 74,5 [1C, 7-C], 172,8 [1C, 8-C]

$^{31}\text{P-NMR}$ (202,47MHz, MeOD) $\delta[\text{ppm}] = 30,3$

IR (KBr) $\nu[\text{cm}^{-1}] = 3384$ $\nu(\text{OH})$, 2928 $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$, 2857 $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$, 2742 $\nu(\text{P-OH})$, 1741 $\nu(\text{C=O})$, 1653 $\nu(\text{C-O})$, 1468 $\delta(\text{CH})$, 1209 $\nu(\text{P=O})$, 1141-1113 $\nu(\text{C-O})$, 1066 $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_3^{2-})$, 1058 $\nu(\text{P-OH})$, 961 $\nu_{\text{s}}(\text{PO}_3^{2-})$, 855 $\delta_{\text{rocking}}(\text{CH}_2)$

DC: $R_f = 0$ (n-Hexan/Ethylacetat/Aceton 2:1:1)

Elementaranalyse [%]: theoretisch: C: 57,02; H: 9,68 experimentell: C: 56,96; H: 9,82

Schmelzpunkt: 78°C

3.6 Synthese von aminoterminierten Tri(ethylenglykol)-alkylphosphonsäuren

Die SA-fähigen Moleküle $\text{NH}_2\text{-EG}_3\text{-C}_{11}\text{-PO}_3\text{H}_2$ und $\text{NH}_2\text{-EG}_3\text{-C}_{17}\text{-PO}_3\text{H}_2$ modifizierten das herkömmliche Strukturkonzept in sofern, dass eine neue funktionelle Gruppe, die Aminogruppe eingeführt wurde, um eine spezifische Anbindung von Proteinen zu erweitern. Vorab durchgeführte Adsorptionsuntersuchungen mit den Verbindungen $\text{COOH-EG}_3\text{-C}_{11}\text{-PO}_3\text{H}_2$, $\text{COOH-EG}_3\text{-C}_{17}\text{-PO}_3\text{H}_2$, $\text{COOH-EG}_3\text{-C}_{11}\text{-PO}_4\text{H}_2$ sowie $\text{COOH-EG}_3\text{-C}_{17}\text{-PO}_4\text{H}_2$ hatten

gezeigt, dass eine Kombination aus der Phosphonatgruppe als oberflächenaktiven Haftgruppe und dem Alkylspacer mit 17 CH₂-Wiederholeinheiten sehr stabile und dicht gepackte Monoschichten auf metalloxidischen Oberflächen ausbilden. Die Verbindung **NH₂-EG₃-C₁₁-PO₃H₂** wurde in diesem Zusammenhang nur dargestellt, um einen bisher unbekannten Syntheseweg zu testen und ihn später auf die Verbindung **NH₂-EG₃-C₁₇-PO₃H₂**, die aufgrund der langen Alkylkette eine geringere Reaktivität aufweist, umzusetzen.

Die Darstellung der Verbindungen **NH₂-EG₃-C₁₁-PO₃H₂** und **NH₂-EG₃-C₁₇-PO₃H₂** umfasste einen sieben- bzw. achtsstufigen Syntheseweg. Die erste Reaktionsstufe diente zum Aufbau des Alkylspacers der Verbindung **NH₂-EG₃-C₁₇-PO₃H₂**. Die Ausgangssubstanz 17-Brom-1-heptadecen wurde über eine Grignard-Reaktion mit einer anschließenden Kupplungsreaktion dargestellt. Die nachfolgende Reaktionsstufe beschreibt eine nucleophile Substitutionsreaktion, die nach dem Mechanismus einer Williamson'schen Ethersynthese verlief. Ausgehend vom Tri(ethylenglykol) wurde der Alkylspacer in Form der Verbindung 17-Brom-1-heptadecen eingeführt. Im nachfolgenden Reaktionsschritt, der Mitsunobu-Reaktion wurde die phthalimidgeschützte Aminogruppe substituiert. Die Hydroborierungsreaktion diente der Umsetzung der endständigen Doppelbindung des Alkylspacers in einen α -ständigen Alkohol. Die Hydroxylgruppe konnte nun in der nachfolgenden Finkelstein-Reaktion über das Tosylat zum Bromid umgesetzt werden. Das α -ständige Bromid reagierte in der Michaelis-Arbuzov-Reaktion mit *tris*-Trimethylsilylphosphit und einer anschließenden Hydrolyse zur Phosphonsäure. Die letzte Reaktionsstufe umfasste die Entschützung des Phthalimides zur Aminogruppe und somit die Bildung der terminalen funktionellen Gruppe.

Ein Überblick über die vollständige Syntheseroute zur Darstellung der Verbindungen **NH₂-EG₃-C₁₁-PO₃H₂** und **NH₂-EG₃-C₁₇-PO₃H₂** wird in der nachfolgenden Abbildung 3-17 gegeben.

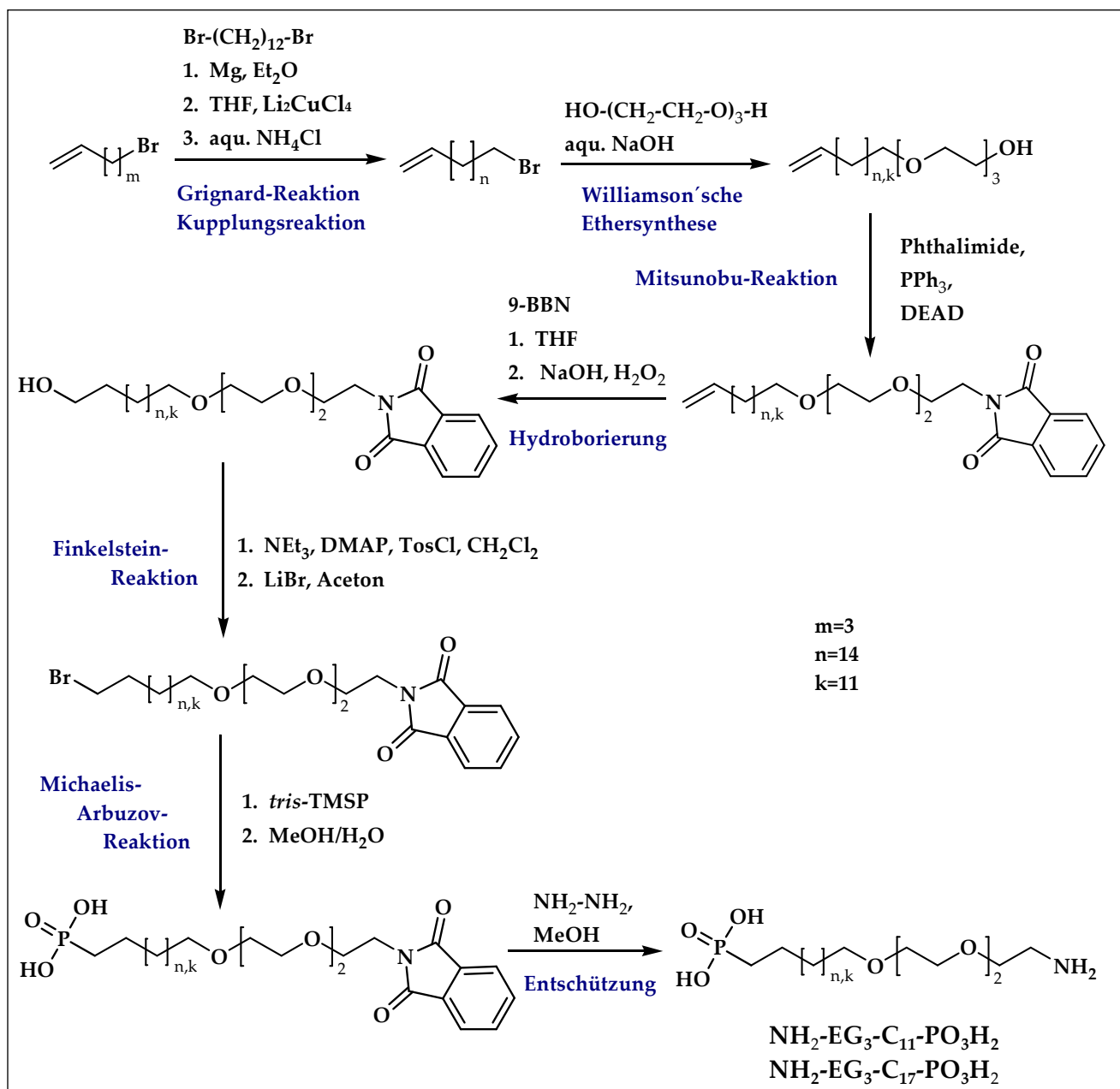


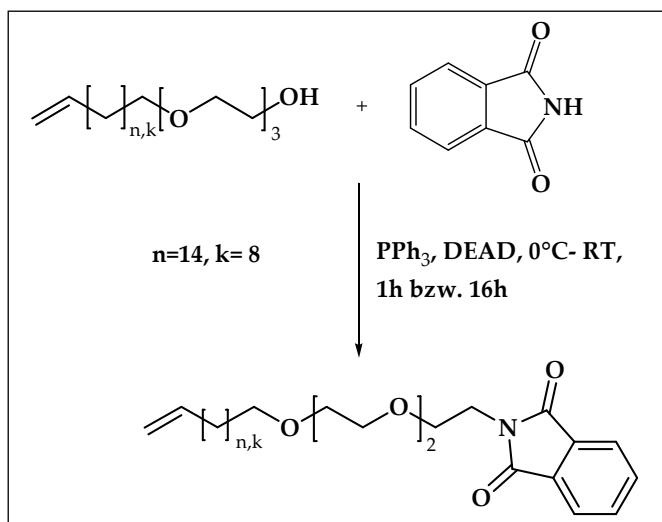
Abbildung 3-17: Reaktionsschema zur Darstellung der 20-Amino-(12,15,18-trioxaicosyl)-phosphonsäure (NH₂-EG₃-C₁₁-PO₃H₂) und der 26-Amino-(18,21,24-trioxahexacosyl)-phosphonsäure (NH₂-EG₃-C₁₇-PO₃H₂)

Die ersten zwei Reaktionsschritte dieser Mehrstufensynthese sind mit den entsprechenden Reaktionsgleichungen, der Reaktionsführungen sowie den Charakterisierungsdaten unter Kapitel 3.4.1 detailliert aufgeführt. Die dritte Reaktionsstufe, die Mitsunobu-Reaktion wird im folgenden Kapitel 3.6.1 beschrieben.

3.6.1 Dritte Synthesestufe: Mitsunobu-Reaktion

Darstellung von N-[(3,6,9-Trioxa)-icos-19-enyl]-phthalimid ($C_6H_4-(CO)_2N-(CH_2)_2-(OCH_2-CH_2)_2-O-(CH_2)_9-CH=CH_2$) und N-[(3,6,9-Trioxa)-hexacos-25-enyl]-phthalimid ($C_6H_4-(CO)_2N-(CH_2)_2-(OCH_2-CH_2)_2-O-(CH_2)_{15}-CH=CH_2$) [105]

Reaktionsgleichung:



Reaktionsführung:

In einem 100 ml Dreihalskolben, versehen mit Thermometer und Rückflusskühler, werden unter Argonatmosphäre zunächst 40 ml trockenes THF vorgelegt und bei Raumtemperatur PPh_3 (7,6 mmol, 2g) und anschließend Phthalimid (7,7 mmol, 1,13 g) gelöst. In einem Schlenkgefäß wird die Verbindung $H-(OCH_2-CH_2)_3-O-(CH_2)_9-CH=CH_2$ bzw. $H-(OCH_2-CH_2)_3-O-(CH_2)_{15}-CH=CH_2$ (6,6 mmol) eingewogen, evakuiert, mit Argon belüftet und in 10 ml trockenem THF gelöst. Die Lösung wird nun bei Raumtemperatur langsam dem Reaktionsgemisch zugetropft und anschließend auf $0^\circ C$ abgekühlt. Bei dieser Temperatur erfolgt die vorsichtige Zugabe von DEAD (40% in Toluol) (7,9 mmol, 3,08 ml). Da es sich dabei um eine stark exotherme Reaktion handelt, sollte die Zugabe langsam und tropfenweise erfolgen und die Temperatur des Reaktionsmediums nicht über $2^\circ C$ liegen. Nach einer Reaktionszeit von 15 min bei $0^\circ C$ wird das Gemisch langsam auf Raumtemperatur erwärmt und weitere 60 min (für $k=8$) bzw. 16h (für $n=14$) gerührt. Wasserstoffperoxid (30%ig, 4 ml) wird dem Reaktionsgemisch bei einer Temperatur von $0^\circ C$ zugeführt, um das überschüssige PPh_3 zu oxidieren. Die Reaktionslösung wird mit Dichlormethan extrahiert und die organische Phase anschließend über $MgSO_4$ getrocknet. Nach der Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum, konnte der

zähflüssige, gelbe Rückstand säulenchromatographisch aufgearbeitet werden (Kieselgel 60, Eluent: n-Hexan/Ethylacetat 3:1). Es resultiert eine gelbe, ölige Substanz, bei der langkettigen Verbindung ein hellgelber Feststoff.

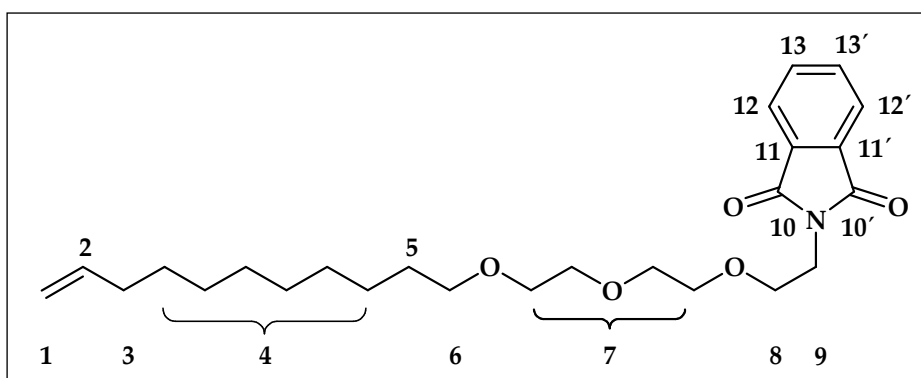
Charakterisierung:

N-[(3,6,9-Trioxa)-icos-19-enyl]-phthalimid

Ausbeute: η =86% [Literatur: 90%]

Summenformel: $C_{25}H_{37}O_5N$

Molare Masse: 431,57 g/mol



1H -NMR (500,13 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]= 1,25 [m, 12H, 4-H], 1,53 [m, 2H, 5-H], 2,00 [m, 2H, 3-H], 3,39 [t, 2H, 6-H], 3,56 [m, 8H, 7-H], 3,72 [t, 2H, 8-H], 3,88 [t, 2H, 9-H], 4,90 [d, J =3,62 Hz, 1H, 1-H], 4,95 [d, J =2,15 Hz, 1H, 1-H], 5,80 [m, J = 6,8 Hz, 1H, 2-H], 7,70 [dd, J = 5,33 Hz, 2H, 12-H und 12'-H], 7,82 [dd, J = 8,35 Hz, 2H, 13-H und 13'-H]

^{13}C -NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]= 29,5 [6C, 4-C], 29,7 [1C, 5-C], 33,8 [1C, 3-C], 37,2 [1C, 9-C], 67,8 [1C, 8-C], 69,9 [1C, 6-C], 70,6 [4C, 7-C], 114,1 [1C, 1-C], 123,2 [2C, 12-C und 12'-C], 132,1 [2C, 13-C und 13'-C], 133,9 [2C, 11-C und 11'-C], 139,2 [1C, 2-C], 168,2 [2C, 10-C und 10'-C]

IR (KBr) ν [cm^{-1}] = 3110 ν (CH_{Aromat}), 3075 ν (CH), 2920 ν_{as} (CH_2), 2851 ν_s (CH_2), 1770-1708 ν ($C=O_{Phthalimid}$), 1650 ν (C-O), 1615 ν (CH_{Aromat}), 1640 ν (C=C), 1465 δ (CH), 1473 und 1398 ν (C-N_{Phthalimid}), 1123 ν (C-O), 753 $\delta_{rocking}$ (CH_2)

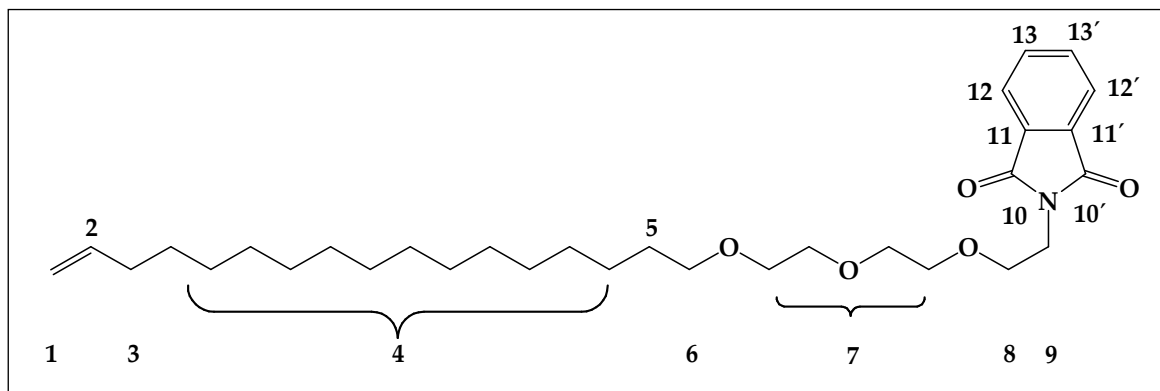
DC: R_f = 0,39 (n-Hexan/Ethylacetat3:1)

N-[(3,6,9-Trioxa)-hexacos-25-enyl]-phthalimid

Ausbeute: η =90% [Literatur: 90%]

Summenformel: C₃₁H₄₉O₅N

Molare Masse: 515,73 g/mol



¹H-NMR (500,13 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 1,23 [m, 26H, 4-H], 1,53 [m, 2H, 5-H], 2,01 [m, 2H, 3-H], 3,39 [t, 2H, 6-H], 3,56 [m, 8H, 7-H], 3,73 [t, 2H, 8-H], 3,88 [t, 2H, 9-H], 4,90 [d, J=3,62 Hz, 1H, 1-H], 4,95 [d, J=2,15 Hz, 1H, 1-H], 5,80 [m, J= 6,8 Hz, 1H, 2-H], 7,70 [dd, J= 5,33 Hz, 2H, 12-H und 12'-H], 7,83 [dd, J= 8,35 Hz, 2H, 13-H und 13'-H]

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ [ppm]= 29,7 [1C, 5-C], 29,5 [12C, 4-C], 33,8 [1C, 3-C], 37,2 [1C, 9-C], 67,8 [1C, 8-C], 69,9 [1C, 6-C], 70,6 [4C, 7-C], 114,1 [1C, 1-C], 123,2 [2C, 12-C und 12'-C], 132,1 [2C, 13-C und 13'-C], 133,9 [2C, 11-C und 11'-C], 139,2 [1C, 2-C], 168,2 [2C, 10-C und 10'-C]

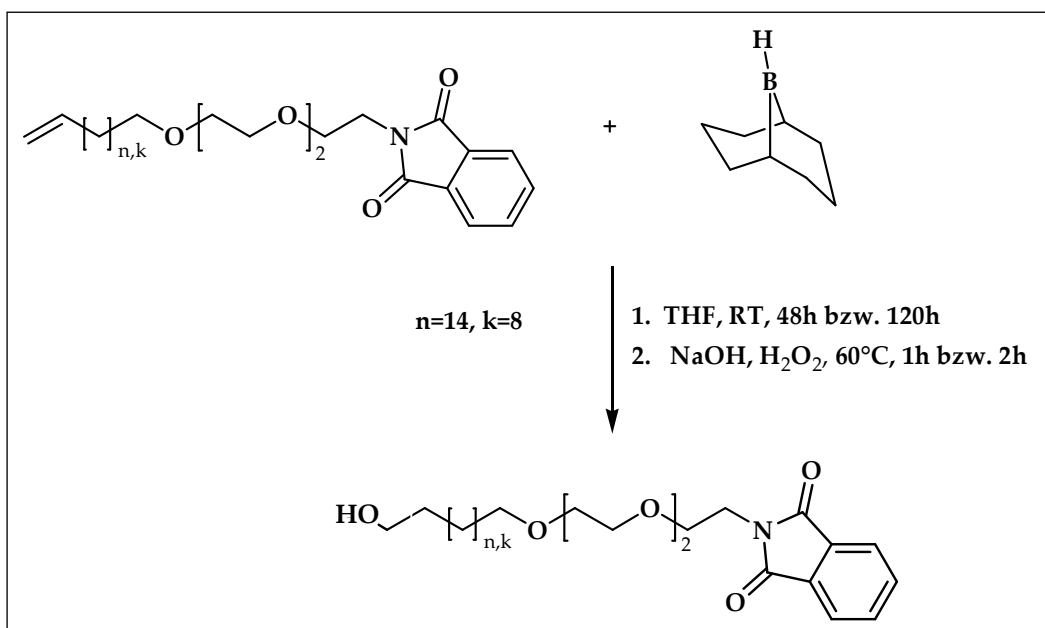
IR (KBr) ν [cm⁻¹] = 3112 ν (CH_{Aromat}), 3074 ν (CH), 2922 ν_{as} (CH₂), 2854 ν_s (CH₂), 1772-1709 ν (C=O_{Phthalimid}), 1652 ν (C-O), 1617 ν (CH_{Aromat}), 1643 ν (C=C), 1467 δ (CH), 1473 und 1398 ν (C-N_{Phthalimid}), 1125 ν (C-O), 757 $\delta_{rocking}$ (CH₂)

DC: R_f = 0,36 (n-Hexan/Ethylacetat3:1)

3.6.2 Vierte Synthesestufe: Hydroborierung

Darstellung von N-[(3,6,9-Trioxa)-icos-20-hydroxy]-phthalimid (C₆H₄-(CO)₂N-(CH₂)₂-(OCH₂-CH₂)₂-O-(CH₂)₁₁-OH) und N-[(3,6,9-Trioxa)-hexacos-26-hydroxy]-phthalimid (C₆H₄-(CO)₂N-(CH₂)₂-(OCH₂-CH₂)₂-O-(CH₂)₁₇-OH) [106]

Reaktionsgleichung:



Reaktionsführung:

Die Reaktionsführung der Hydroborierung entspricht der detaillierten Beschreibung unter Kapitel 3.4.4.

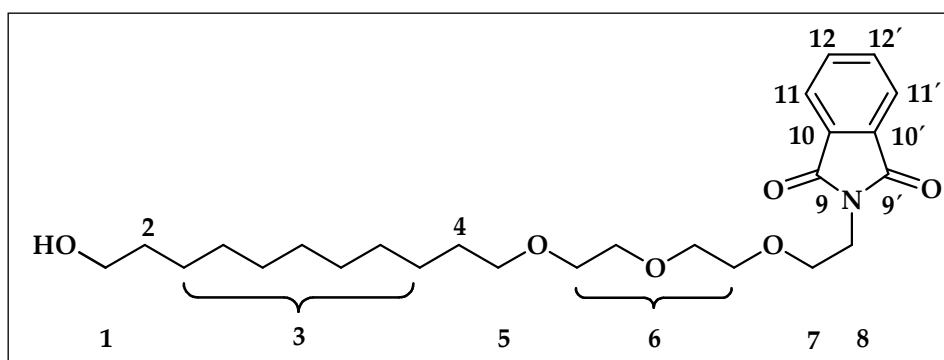
Charakterisierung:

N-[(3,6,9-Trioxa)-icos-20-hydroxy]-phthalimid

Ausbeute: $\eta=72\%$ [Literatur: 90%]

Summenformel: C₂₅H₃₉O₆N

Molare Masse: 449,59 g/mol



¹H-NMR (500,13 MHz, CDCl₃) δ [ppm]= 1,25 [m, 12H, 3-H], 1,52 [m, 4H, 2-H und 4-H], 3,38 [t, 2H, 5-H], 3,53 [m, 2H, 1-H], 3,56 [m, 8H, 6-H], 3,72 [t, 2H, 7-H], 3,88 [t, 2H, 8-H], 7,70 [dd, J= 5,33 Hz, 2H, 11-H und 11'-H], 7,83 [dd, J= 8,35 Hz, 2H, 12-H und 12'-H]

^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3) $\delta[\text{ppm}]$ = 29,5 [7C, 3-C], 29,7 [1C, 4-C], 33,8 [1C, 2-C], 37,2 [1C, 8-C], 62,7 [1C, 1-C], 67,8 [1C, 7-C], 69,9 [1C, 5-C], 70,6 [4C, 6-C], 123,2 [2C, 11-C und 11'-C], 132,1 [2C, 12-C und 12'-C], 133,9 [2C, 10-C und 10'-C], 168,2 [2C, 9-C und 9'-C]

IR (KBr) $\nu[\text{cm}^{-1}]$ = 3462 $\nu(\text{OH})$, 3114 $\nu(\text{CH}_{\text{Aromat}})$, 2925 $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$, 2854 $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$, 1774-1706 $\nu(\text{C}=\text{O}_{\text{Phthalimid}})$, 1653 $\nu(\text{C}-\text{O})$, 1617 $\nu(\text{CH}_{\text{Aromat}})$, 1466 $\delta(\text{CH})$, 1475 und 1398 $\nu(\text{C}-\text{N}_{\text{Phthalimid}})$, 1125 $\nu(\text{C}-\text{O})$, 753 $\delta_{\text{rocking}}(\text{CH}_2)$

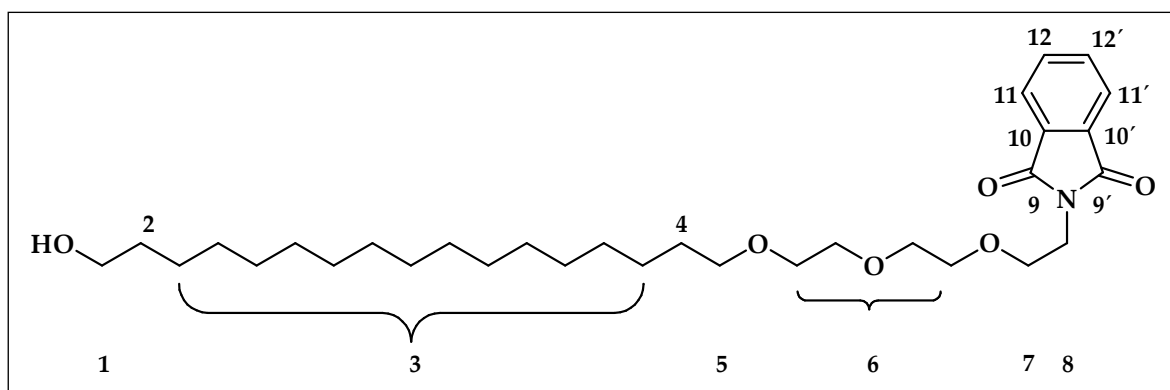
DC: R_f = 0,41 (n-Hexan/Ethylacetat2:5)

***N*-[(3,6,9-Trioxa)-hexacos-26-hydroxy]-phthalimid**

Ausbeute: η =67% [Literatur: 90%]

Summenformel: $\text{C}_{31}\text{H}_{51}\text{O}_6\text{N}$

Molare Masse: 533,75 g/mol



^1H -NMR (500,13 MHz, CDCl_3) $\delta[\text{ppm}]$ = 1,25 [m, 26H, 3-H], 1,52 [m, 4H, 2-H und 4-H], 3,38 [t, 2H, 5-H], 3,53 [m, 2H, 1-H], 3,56 [m, 8H, 6-H], 3,72 [t, 2H, 7-H], 3,88 [t, 2H, 8-H], 7,70 [dd, J = 5,33 Hz, 2H, 11-H und 11'-H], 7,83 [dd, J = 8,35 Hz, 2H, 12-H und 12'-H]

^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3) $\delta[\text{ppm}]$ = 29,5 [13C, 3-C], 29,7 [1C, 4-C], 33,8 [1C, 2-C], 37,2 [1C, 8-C], 62,7 [1C, 1-C], 67,8 [1C, 7-C], 69,9 [1C, 5-C], 70,6 [4C, 6-C], 123,2 [2C, 11-C und 11'-C], 132,1 [2C, 12-C und 12'-C], 133,9 [2C, 10-C und 10'-C], 168,2 [2C, 9-C und 9'-C]

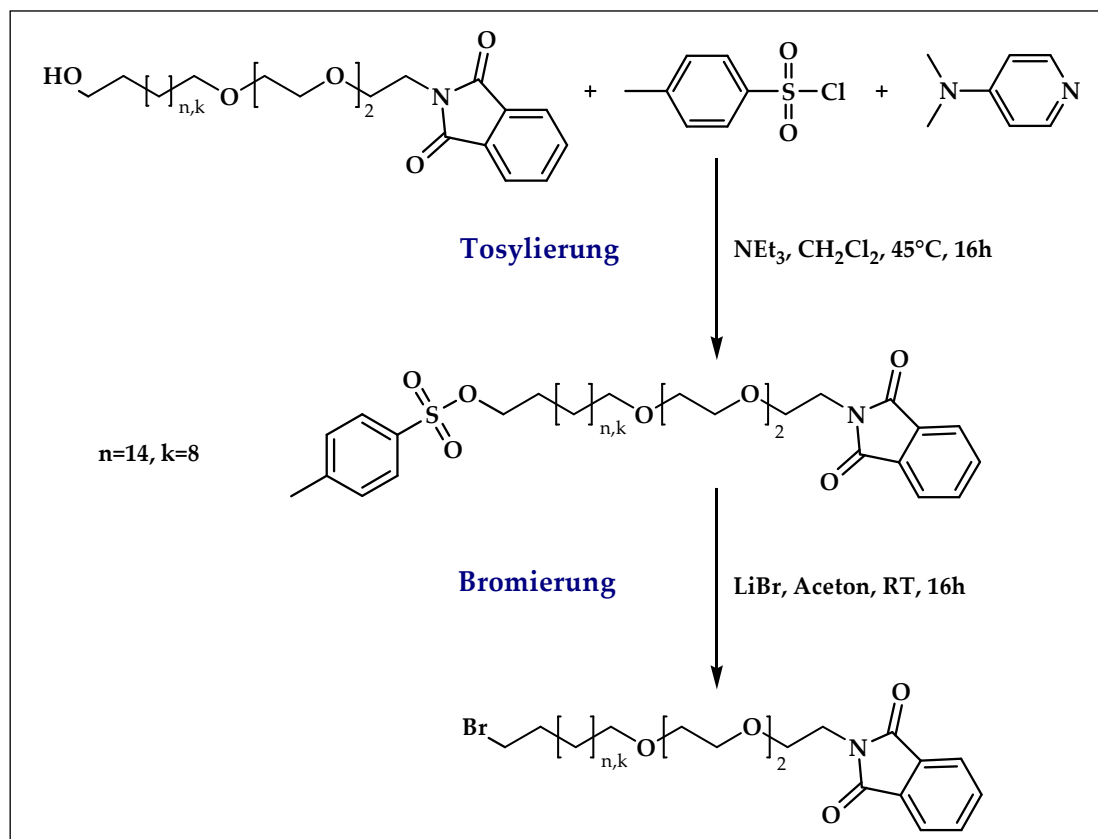
IR (KBr) $\nu[\text{cm}^{-1}]$ = 3460 $\nu(\text{OH})$, 3110 $\nu(\text{CH}_{\text{Aromat}})$, 2920 $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$, 2850 $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$, 1770-1708 $\nu(\text{C}=\text{O}_{\text{Phthalimid}})$, 1650 $\nu(\text{C}-\text{O})$, 1615 $\nu(\text{CH}_{\text{Aromat}})$, 1465 $\delta(\text{CH})$, 1473 und 1398 $\nu(\text{C}-\text{N}_{\text{Phthalimid}})$, 1123 $\nu(\text{C}-\text{O})$, 748 $\delta_{\text{rocking}}(\text{CH}_2)$

DC: R_f = 0,68 (n-Hexan/Ethylacetat2:5)

3.6.3 Fünfte Synthesestufe: Finkelstein-Reaktion

Darstellung von N-[(3,6,9-Trioxa)-icos-20-bromo]-phthalimid ($C_6H_4-(CO)_2N-(CH_2)_2-(OCH_2-CH_2)_2-O-(CH_2)_{11}-Br$) und N-[(3,6,9-Trioxa)-hexacos-26-bromo]-phthalimid ($C_6H_4-(CO)_2N-(CH_2)_2-(OCH_2-CH_2)_2-O-(CH_2)_{17}-Br$) [101]

Reaktionsgleichungen:



Reaktionsführung:

Die Reaktionsführung der Finkelstein-Reaktion entspricht der detaillierten Beschreibung unter Kapitel 3.5.1.

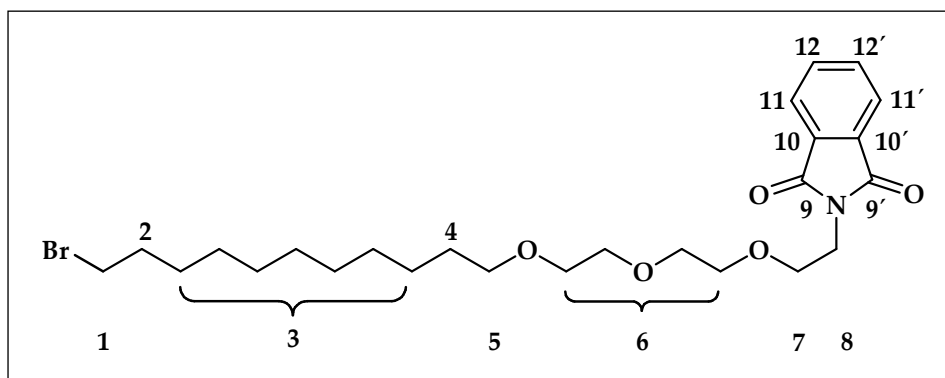
Charakterisierung:

N-[(3,6,9-Trioxa)-icos-20-bromo]-phthalimid

Ausbeute: $\eta=72\%$ [Literatur: 85%]

Summenformel: $C_{25}H_{38}O_5NBr$

Molare Masse: 512,48 g/mol



$^1\text{H-NMR}$ (500,13 MHz, CDCl_3) δ [ppm]= 1,25 [m, 12H, 3-H], 1,58 [m, 2H, 4-H], 1,83 [m, 2H, 2-H], 3,31 [t, 2H, 1-H], 3,39 [t, 2H, 5-H], 3,56 [m, 8H, 6-H], 3,73 [t, 2H, 7-H], 3,88 [t, 2H, 8-H], 7,70 [dd, J = 5,33 Hz, 2H, 11-H und 11'-H], 7,83 [dd, J = 8,35 Hz, 2H, 12-H und 12'-H]

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ [ppm]= 29,5 [7C, 3-C], 31,0 [1C, 4-C], 32,8 [1C, 1-C], 34,1 [1C, 2-C], 37,2 [1C, 8-C], 67,9 [1C, 7-C], 69,9 [1C, 5-C], 70,6 [4C, 6-C], 123,2 [2C, 11-C und 11'-C], 132,1 [2C, 12-C und 12'-C], 133,9 [2C, 10-C und 10'-C], 168,2 [2C, 9-C und 9'-C]

IR (KBr) ν [cm^{-1}] = 3111 $\nu(\text{CH}_{\text{Aromat}})$, 2923 $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$, 2852 $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$, 1771-1709 $\nu(\text{C}=\text{O}_{\text{Phthalimid}})$, 1652 $\nu(\text{C}-\text{O})$, 1617 $\nu(\text{CH}_{\text{Aromat}})$, 1468 $\delta(\text{CH})$, 1475 und 1398 $\nu(\text{C}-\text{N}_{\text{Phthalimid}})$, 1143-1121 $\nu(\text{C}-\text{O})$, 752 $\delta_{\text{rocking}}(\text{CH}_2)$, 587 $\nu(\text{C}-\text{Br})$

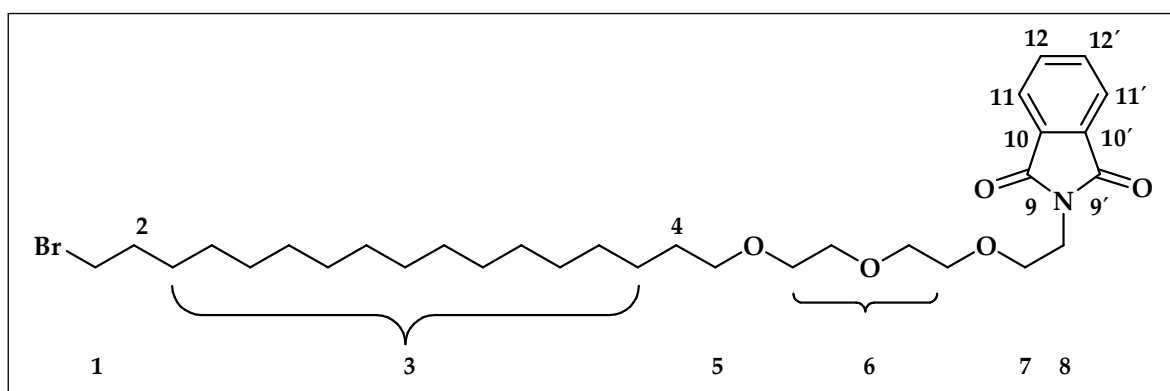
DC: R_f = 0,48 (n-Hexan/Ethylacetat2:1)

N-[(3,6,9-Trioxa)-hexacos-26-bromo]-phthalimid

Ausbeute: η =67% [Literatur: 85%]

Summenformel: $\text{C}_{31}\text{H}_{50}\text{O}_5\text{NBr}$

Molare Masse: 596,65 g/mol



$^1\text{H-NMR}$ (500,13 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 1,25 [m, 26H, 3-H], 1,58 [m, 2H, 4-H], 1,83 [m, 2H, 2-H], 3,31 [t, 2H, 1-H], 3,39 [t, 2H, 5-H], 3,56 [m, 8H, 6-H], 3,73 [t, 2H, 7-H], 3,88 [t, 2H, 8-H], 7,70 [dd, J = 5,33 Hz, 2H, 11-H und 11'-H], 7,83 [dd, J = 8,35 Hz, 2H, 12-H und 12'-H]

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 29,5 [13C, 3-C], 31,0 [1C, 4-C], 32,8 [1C, 1-C], 34,1 [1C, 2-C], 37,2 [1C, 8-C], 67,9 [1C, 7-C], 69,9 [1C, 5-C], 70,6 [4C, 6-C], 123,2 [2C, 11-C und 11'-C], 132,1 [2C, 12-C und 12'-C], 133,9 [2C, 10-C und 10'-C], 168,2 [2C, 9-C und 9'-C]

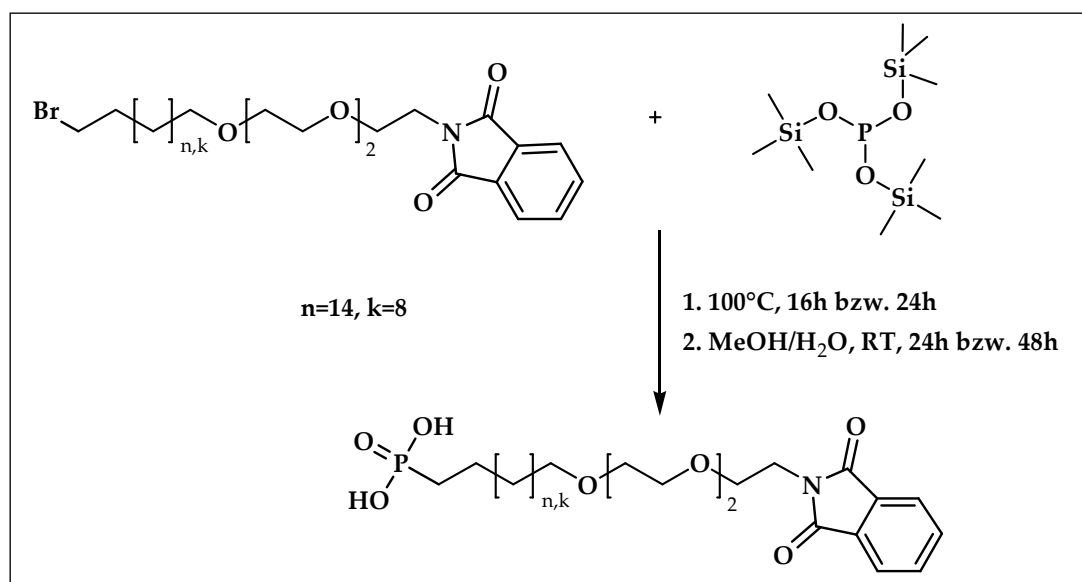
IR (KBr) ν [cm^{-1}] = 3110 $\nu(\text{CH}_{\text{Aromat}})$, 2925 $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$, 2854 $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$, 1770-1710 $\nu(\text{C=O}_{\text{Phthalimid}})$, 1654 $\nu(\text{C-O})$, 1613 $\nu(\text{CH}_{\text{Aromat}})$, 1467 $\delta(\text{CH})$, 1473 und 1398 $\nu(\text{C-N}_{\text{Phthalimid}})$, 1145-1125 $\nu(\text{C-O})$, 753 $\delta_{\text{rocking}}(\text{CH}_2)$, 585 $\nu(\text{C-Br})$

DC: R_f = 0,32 (n-Hexan/Ethylacetat2:1)

3.6.4 Sechste Synthesestufe: Michaelis-Arbuzov-Reaktion

Darstellung von N-Phthalimid-(20-[3,6,9-trioxa]-icosyl)-phosphonsäure ($\text{C}_6\text{H}_4-(\text{CO})_2\text{N}-(\text{CH}_2)_2-(\text{OCH}_2-\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_{11}-\text{PO}_3\text{H}_2$) und N-Phthalimid-(26-[3,6,9-trioxa]-hexacosyl)-phosphonsäure ($\text{C}_6\text{H}_4-(\text{CO})_2\text{N}-(\text{CH}_2)_2-(\text{OCH}_2-\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_{17}-\text{PO}_3\text{H}_2$) [108, 109]

Reaktionsgleichung:



Reaktionsführung:

Die Reaktionsführung der Michaelis-Arbuzov-Reaktion entspricht der detaillierten Beschreibung unter Kapitel 3.5.2, eine Variation der Parameter tritt ausschließlich bei den

Reaktionszeiten sowie der Reaktionstemperatur auf. So rührt das Gemisch bei 100°C 16h (für k=8) und 24h (für n=14). Die Hydrolyse erfolgt in 24h (für k=8) und 48h (für n=14) bei Raumtemperatur.

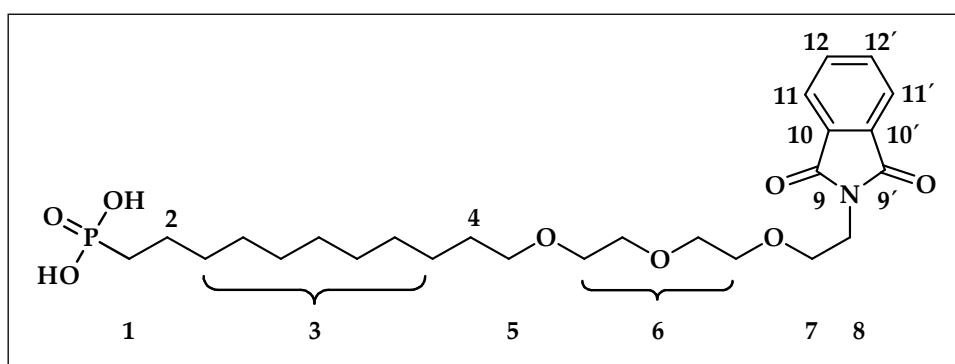
Charakterisierung:

N-Phthalimid-(20-[3,6,9-trioxa]-icosyl)-phosphonsäure

Ausbeute: η =78% [Literatur: 81%]

Summenformel: C₂₅H₄₀O₈NP

Molare Masse: 513,57 g/mol



¹H-NMR (500,13 MHz, MeOD) δ [ppm] = 1,38 [m, 14H, 3-H], 1,63 [m, 2H, 4-H], 1,48 [m, 4H, 1-H und 2-H], 3,55 [t, 2H, 5-H], 3,74 [m, 8H, 6-H], 3,87 [t, 2H, 7-H], 4,02 [t, 2H, 8-H], 7,92 [dd, 2H, 11-H und 11'-H], 8,26 [dd, 2H, 12-H und 12'-H]

¹³C-NMR (75 MHz, MeOD) δ [ppm] = 30,3 [1C, 1-C], 30,5 [7C, 3-C], 30,7 [1C, 4-C], 23,8 [1C, 2-C], 38,2 [1C, 8-C], 68,9 [1C, 7-C], 69,8 [1C, 5-C], 71,4 [4C, 6-C], 124,2 [2C, 11-C und 11'-C], 133,3 [2C, 12-C und 12'-C], 134,9 [2C, 10-C und 10'-C], 169,3 [2C, 9-C und 9'-C]

³¹P-NMR (202,47MHz, MeOD) δ [ppm] = 30,16

IR (KBr) ν [cm⁻¹] = 3112 ν (CH_{Aromat}), 2922 ν_{as} (CH₂), 2848 ν_s (CH₂), 2745 ν (P-OH), 1768-1706 ν (C=O_{Phthalimid}), 1649 ν (C-O), 1617 ν (CH_{Aromat}), 1463 δ (CH), 1475 und 1396 ν (C-N_{Phthalimid}), 1209 ν (P=O), 1145-1123 ν (C-O), 1118 ν_{as} (P-O₃²⁻), 1055 ν (P-OH), 962 ν_s (P-O₃²⁻), 753 $\delta_{rocking}$ (CH₂)

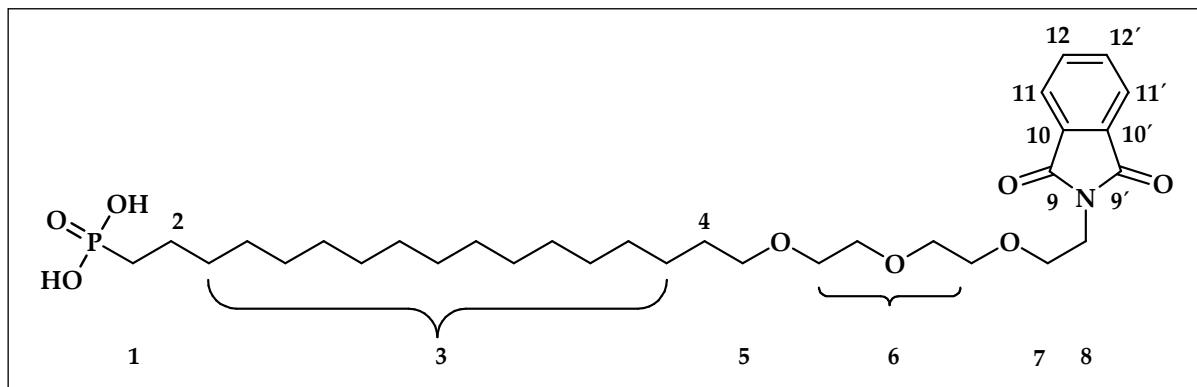
DC: R_f = 0 (n-Hexan/Ethylacetat2:1)

N-Phthalimid-(26-[3,6,9-trioxa]-hexacosyl)-phosphonsäure

Ausbeute: $\eta=42\%$ [Literatur: 81%]

Summenformel: $C_{31}H_{52}O_8NP$

Molare Masse: 597,73 g/mol



1H -NMR (500,13 MHz, MeOD) δ [ppm] = 1,38 [m, 26H, 3-H], 1,63 [m, 2H, 4-H], 1,48 [m, 4H, 1-H und 2-H], 3,55 [t, 2H, 5-H], 3,74 [m, 8H, 6-H], 3,87 [t, 2H, 7-H], 4,02 [t, 2H, 8-H], 7,92 [dd, 2H, 11-H und 11'-H], 8,26 [dd, 2H, 12-H und 12'-H]

^{13}C -NMR (75 MHz, MeOD) δ [ppm] = 30,3 [1C, 1-C], 30,5 [13C, 3-C], 30,7 [1C, 4-C], 23,8 [1C, 2-C], 38,2 [1C, 8-C], 68,9 [1C, 7-C], 69,8 [1C, 5-C], 71,4 [4C, 6-C], 124,2 [2C, 11-C und 11'-C], 133,3 [2C, 12-C und 12'-C], 134,9 [2C, 10-C und 10'-C], 169,3 [2C, 9-C und 9'-C]

^{31}P -NMR (202,47MHz, MeOD) δ [ppm] = 30,32

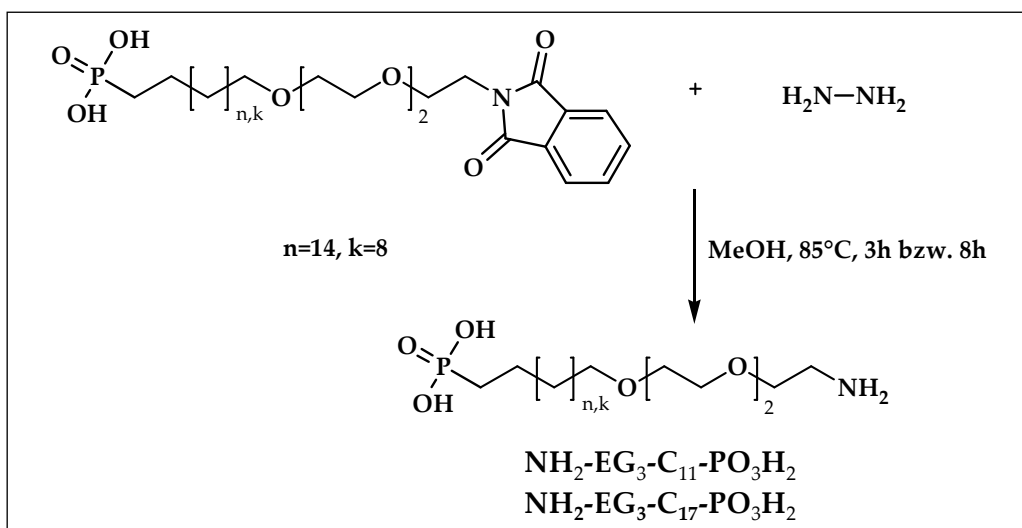
IR (KBr) ν [cm^{-1}] = 3110 ν (CH_{Aromat}), 2920 ν_{as} (CH₂), 2850 ν_s (CH₂), 2748 ν (P-OH), 1770-1708 ν (C=O_{Phthalimid}), 1650 ν (C-O), 1615 ν (CH_{Aromat}), 1465 δ (CH), 1473 und 1398 ν (C-N_{Phthalimid}), 1208 ν (P=O), 1145-1123 ν (C-O), 1120 ν_{as} (P-O₃²⁻), 1054 ν (P-OH), 965 ν_s (P-O₃²⁻), 750 $\delta_{rocking}$ (CH₂)

DC: $R_f = 0$ (n-Hexan/Ethylacetat2:1)

3.6.5 Siebente Synthesestufe: Entschützungsreaktion

Darstellung von Amino-(20-[3,6,9-trioxa]-icosyl)-monophosphonsäure (NH₂-EG₃-CH₁₁-PO₃H₂) und Amino-(26-[3,6,9-trioxa]-hexacosyl)-monophosphonsäure (NH₂-EG₃-CH₁₇-PO₃H₂) [105]

Reaktionsgleichung:



Reaktionsführung:

In einem 50 ml Schlenkgefäß wird die Verbindung $\text{C}_6\text{H}_4\text{-(CO)}_2\text{N-(CH}_2)_2\text{-(OCH}_2\text{-CH}_2)_2\text{-O-(CH}_2)_{11}\text{-PO}_3\text{H}_2$ bzw. $\text{C}_6\text{H}_4\text{-(CO)}_2\text{N-(CH}_2)_2\text{-(OCH}_2\text{-CH}_2)_2\text{-O-(CH}_2)_{17}\text{-PO}_3\text{H}_2$ (1,0 mmol) in 30 ml Methanol gelöst und anschließend auf 0°C abgekühlt. Bei dieser Temperatur erfolgt die Zugabe des Hydrazins (18,36 mmol, 0,59g). Nachfolgend wird das Reaktionsgemisch vorsichtig unter Vakuum entgast und mit Argon belüftet. Diese Prozedur wird dreimal wiederholt, um eine sauerstofffreie Atmosphäre zu gewährleisten. Anschließend wird das Reaktionsgemisch für 3h (für k=8) bzw. 8h (für n=14) auf 85°C erwärmt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wird der entstandene Feststoff mittels Filtration von der Reaktionslösung getrennt und das Filtrat mehrmals mit Chloroform extrahiert. Die organischen Phasen werden vereint, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird aus einem n-Hexan/Ethylacetat-Gemisch (1:1) umkristallisiert. Es resultiert ein farbloser, pulverförmiger Feststoff.

Charakterisierung:

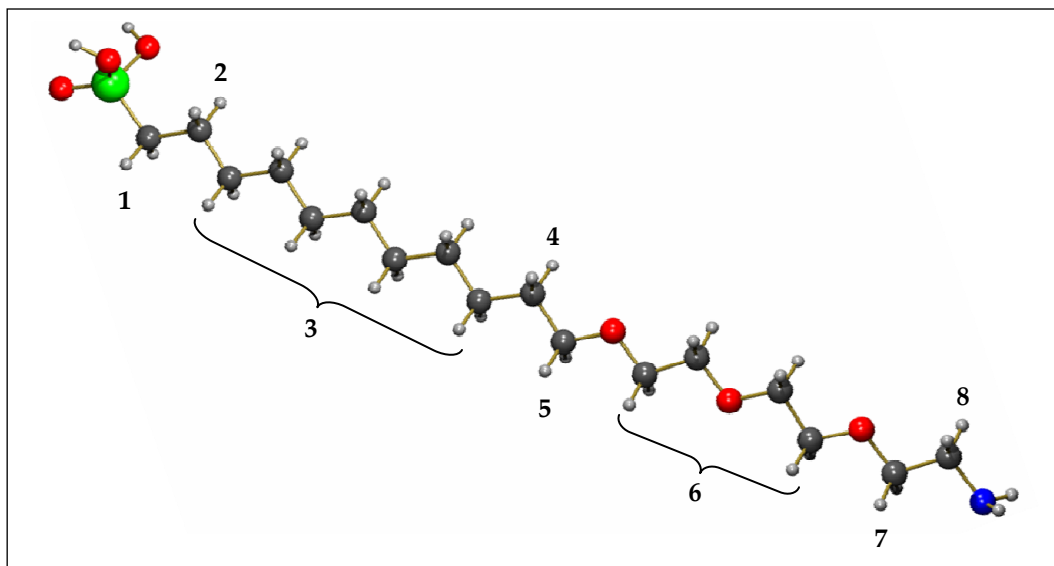
Amino-(20-[3,6,9-trioxa]-icosyl)-monophosphonsäure

$\text{NH}_2\text{-EG}_3\text{-CH}_{11}\text{-PO}_3\text{H}_2$

Ausbeute: $\eta=89\%$ [Literatur: 90%]

Summenformel: $\text{C}_{17}\text{H}_{38}\text{O}_6\text{NP}$

Molare Masse: 383,47 g/mol



$^1\text{H-NMR}$ (500,13 MHz, MeOD) δ [ppm] = 1,38 [m, 14H, 3-H], 1,63 [m, 2H, 4-H], 1,48 [m, 4H, 1-H und 2-H], 3,17 [t, 2H, 8-H], 3,54 [t, 2H, 5-H], 3,66 [t, 2H, 7-H], 3,74 [m, 8H, 6-H]

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, MeOD) δ [ppm] = 30,3 [1C, 1-C], 30,5 [7C, 3-C], 30,7 [1C, 4-C], 23,8 [1C, 2-C], 43,2 [1C, 8-C], 69,8 [1C, 5-C], 71,4 [4C, 6-C], 74,5 [1C, 7-C]

$^{31}\text{P-NMR}$ (202,47MHz, MeOD) δ [ppm] = 30,16

IR (KBr) ν [cm^{-1}] = 3415 $\nu_{\text{as}}(\text{NH}_2)$, 3361 $\nu_{\text{s}}(\text{NH}_2)$, 2926 $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$, 2855 $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$, 2743 $\nu(\text{P-OH})$, 1773-1652 $\nu(\text{C-O})$, 1467 $\delta(\text{CH})$, 1201 $\nu(\text{P=O})$, 1147-1125 $\nu(\text{C-O})$, 1120 $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_3^{2-})$, 1055 $\nu(\text{P-OH})$, 962 $\nu_{\text{s}}(\text{PO}_3^{2-})$, 755 $\delta_{\text{rocking}}(\text{CH}_2)$

DC: $R_f = 0$ (n-Hexan/Ethylacetat2:1)

Elementaranalyse [%]: theoretisch: C: 53,25; H: 9,99 experimentell: C: 53,13; H: 10,02

Schmelzpunkt: 79°C

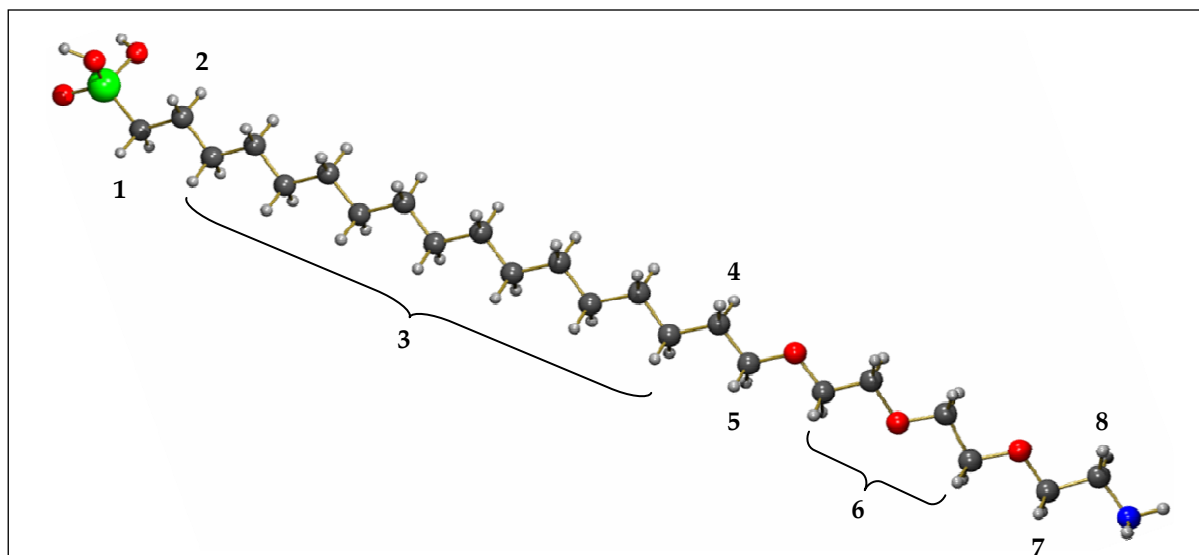
Amino-(26-[3,6,9-trioxa]-hexacosyl)-monophosphonsäure

$\text{NH}_2\text{-EG}_3\text{-CH}_{17}\text{-PO}_3\text{H}_2$

Ausbeute: $\eta = 83\%$ [Literatur: 90%]

Summenformel: $\text{C}_{23}\text{H}_{50}\text{O}_6\text{NP}$

Molare Masse: 467,63 g/mol



$^1\text{H-NMR}$ (500,13 MHz, MeOD) δ [ppm] = 1,38 [m, 26H, 3-H], 1,63 [m, 2H, 4-H], 1,48 [m, 4H, 1-H und 2-H], 3,15 [t, 2H, 8-H], 3,55 [t, 2H, 5-H], 3,66 [t, 2H, 7-H], 3,74 [m, 8H, 6-H]

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, MeOD) δ [ppm] = 30,3 [1C, 1-C], 30,5 [13C, 3-C], 30,7 [1C, 4-C], 23,8 [1C, 2-C], 43,2 [1C, 8-C], 69,8 [1C, 5-C], 71,4 [4C, 6-C], 74,5 [1C, 7-C]

$^{31}\text{P-NMR}$ (202,47MHz, MeOD) δ [ppm] = 30,32

IR (KBr) ν [cm^{-1}] = 3417 $\nu_{\text{as}}(\text{NH}_2)$, 3360 $\nu_{\text{s}}(\text{NH}_2)$, 2927 $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$, 2856 $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$, 2748 $\nu(\text{P-OH})$, 1653 $\nu(\text{C-O})$, 1467 $\delta(\text{CH})$, 1201 $\nu(\text{P=O})$, 1147-1125 $\nu(\text{C-O})$, 1115 $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_3^{2-})$, 1053 $\nu(\text{P-OH})$, 965 $\nu_{\text{s}}(\text{PO}_3^{2-})$, 752 $\delta_{\text{rocking}}(\text{CH}_2)$

DC: $R_f = 0$ (n-Hexan/Ethylacetat2:1)

Elementaranalyse [%]: theoretisch: C: 59,08; H: 10,78 experimentell: C: 59,05; H: 10,85

Schmelzpunkt: 82°C

3.7 Synthese der carboxylterminierten Alkylphosphonsäure

Die langkettige carboxylterminierte Alkylphosphonsäure $\text{COOH-C}_{17}\text{-PO}_3\text{H}_2$ dient zum Einen als Referenzverbindung zu den entsprechenden Tri(ethylenglykol)-haltigen Spezies, zum Anderen stellt es einen passenden Linker zur Oberflächenanbindung von Hexa(ethylenglykol) bzw. Polyglycidol mittels DCC-Kupplung an die Carboxygruppe dar.

Die Darstellung der Verbindung umfasste vier Reaktionsstufen. Ausgehend von der Grignard- und Kupplungsreaktion, die zu Verlängerung der Alkylkette des Spacers diente, wurde im zweiten Reaktionsschritt die terminale Doppelbindung durch eine Hydroborierung zum endständigen Alkohol umgesetzt. An der Hydroxygruppe konnte anschließend durch eine Williamson'sche Ethersynthese die durch einen *tert*-Butylester geschützte Carboxylgruppe eingeführt werden. Das terminale Bromid wurde in der Michaelis-Arbuzov-Reaktion zur Phosphonsäuregruppe umgesetzt und gleichzeitig die funktionelle Gruppe entschützt.

Der Syntheseweg zur Darstellung der Verbindung $\text{COOH-C}_{17}\text{-PO}_3\text{H}_2$ ist in der folgenden Abbildung 3-18 aufgeführt.

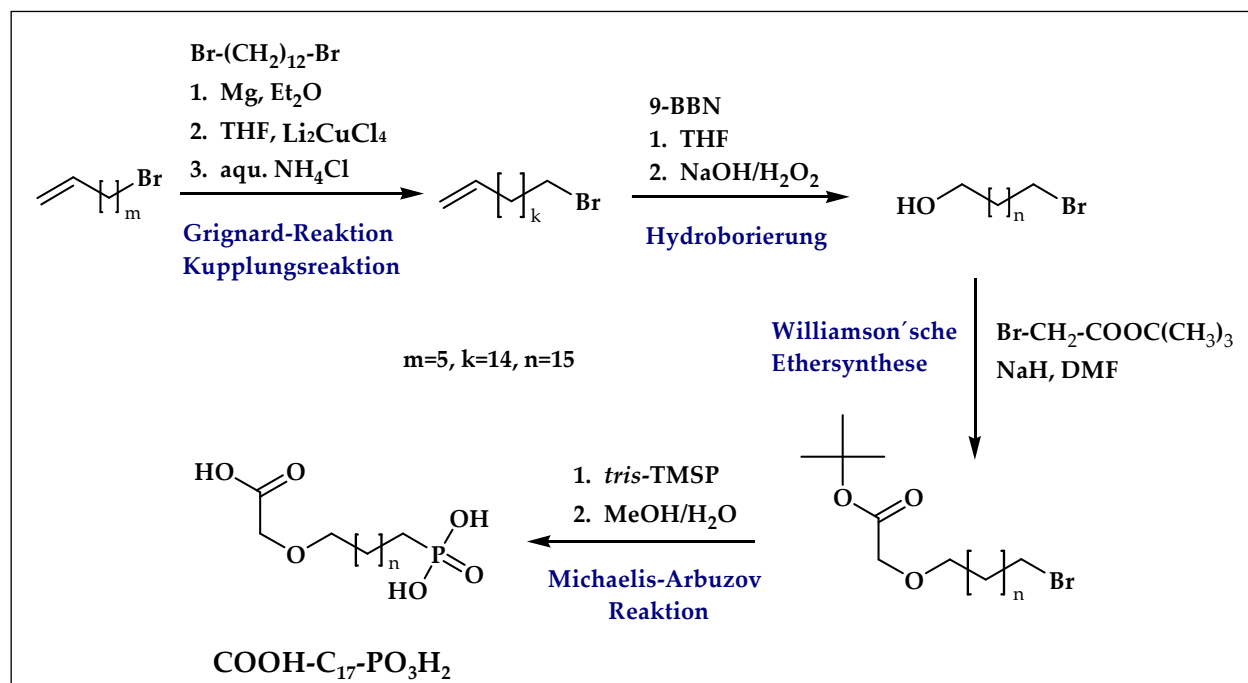


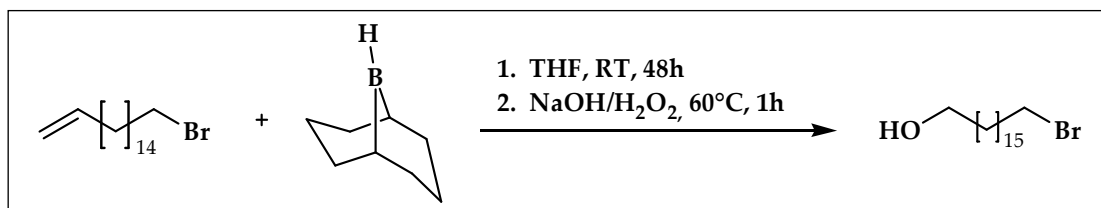
Abbildung 3-18: Reaktionsschema zur Darstellung der [17-Phosphono-heptadecyloxy]-essigsäure ($\text{COOH-EG}_3\text{-C}_{17}\text{-PO}_3\text{H}_2$)

Die erste Synthesestufe, die Grignard-Reaktion mit anschließender Kupplung wurde, wie in Kapitel 3.4.1 beschrieben, durchgeführt.

3.7.1 Zweite Synthesestufe: Hydroborierung

Darstellung von 17-Bromo-heptadecan-1-ol (OH-(CH₂)₁₇-Br) [106]

Reaktionsgleichung:



Reaktionsführung:

In einem 100 ml Dreihalskolben wird unter Argonatmosphäre 17-Brom-1-heptadecen (11,19 mmol, 3,55g) in trockenem THF (35 ml) gelöst und auf 0°C abgekühlt. Bei dieser Temperatur erfolgt die tropfenweise Zugabe von 0,5 M 9-BBN-Lösung in THF (22,38 mmol; 44,6 ml). Das Reaktionsgemisch rührt für 48h bei Raumtemperatur. Während dieser Zeit wird mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie die Präsenz der Ausgangsverbindung kontrolliert. Nach beendeter Reaktion erfolgt die Hydrolyse des Produktes durch die langsame Zugabe von 6 M Natronlauge (5,7 ml) sowie Wasserstoffperoxid (30%, 4,5 ml) bei 0°C, dabei sollte die Temperatur des Reaktionsgemisches den Wert von 5°C nicht übersteigen. Um eine vollständige Umsetzung zu erzielen, wird das Gemisch für 1h auf 60°C erwärmt. Die Aufarbeitung erfolgt durch Extraktion mit Ethylacetat, die vereinten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt säulenchromatographisch. (Kieselgel 60, Eluent: n-Hexan/Ethylacetat 2:5).

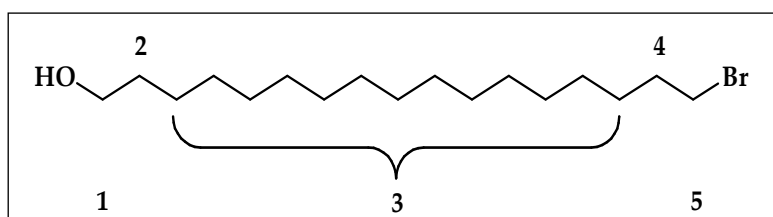
Charakterisierung:

17-Bromo-heptadecan-1-ol

Ausbeute: η =83% [Literatur: 90%]

Summenformel: C₁₇H₃₅OBr

Molare Masse: 335,37 g/mol



$^1\text{H-NMR}$ (500,13 MHz, CDCl_3) $\delta[\text{ppm}] = 1,27 [\text{m}, 26\text{H}, 3\text{-H}], 1,55 [\text{m}, 2\text{H}, 2\text{-H}], 1,84 [\text{m}, 2\text{H}, 4\text{-H}], 3,41 [\text{t}, J=13,6 \text{ Hz}, 2\text{H}, 5\text{-H}], 3,65 [\text{t}, J=13,3 \text{ Hz}, 2\text{H}, 1\text{-H}]$

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) $\delta[\text{ppm}] = 29,6 [13\text{C}, 3\text{-C}], 32,8 [1\text{C}, 5\text{-C}], 33,7 [1\text{C}, 2\text{-C}], 34,1 [1\text{C}, 4\text{-C}], 63,4 [1\text{C}, 1\text{-C}]$

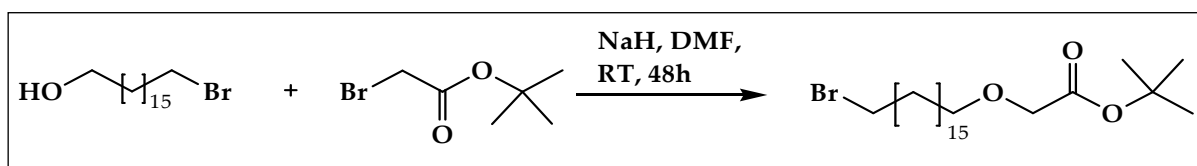
IR (KBr) $\nu[\text{cm}^{-1}] = 3461 \nu(\text{OH}), 2928 \nu_{\text{as}}(\text{CH}_2), 2855 \nu_{\text{s}}(\text{CH}_2), 1655 \nu(\text{C-O}), 1461 \delta(\text{CH}), 1125 \nu(\text{C-O}), 857 \delta_{\text{rocking}}(\text{CH}_2), 585 \nu(\text{C-Br})$

DC: $R_f = 0,63$ (n-Hexan/Ethylacetat 2:5)

3.7.2 Dritte Synthesestufe: Williamson'sche Ethersynthese

Darstellung von (17-Bromo-heptadecyloxy)-essigsäure-tert-butylester ($(\text{CH}_3)_3\text{C-OOC-CH}_2\text{-O-(CH}_2)_{17}\text{-Br}$) [104, 105]

Reaktionsgleichung:



Reaktionsführung:

In einem ausgeheizten 250 ml Zweihalskolben werden unter Argonatmosphäre die Verbindung **OH-(CH₂)₁₇-Br** (5,6 mmol) in trockenem DMF (56 ml) gelöst und anschließend bei einer Temperatur von 0°C Natriumhydrid (60% Dispersion in Mineralöl) (11,2 mmol; 0,27 g) im Argongegenstrom portionsweise zugegeben. Das Reaktionsgemisch rührt 30min bei 0°C. Nachdem die Wasserstoffentwicklung etwas nachgelassen hat, erfolgt die langsame Zugabe von tert-Butylbromacetat (8,4 mmol; 1,64 g) ebenfalls bei einer Temperatur von 0°C. Anschließend rührt das Reaktionsgemisch für weitere 48h bei Raumtemperatur. Zur Aufarbeitung wird das Gemisch mit Ethylacetat (100 ml) versetzt und zunächst dreimal mit destilliertem Wasser sowie Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Nach der Trocknung über MgSO_4 wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel 60, Eluent: Dichlormethan/Ethylacetat/n-Hexan 5:3:2). Es wird eine gelbe, ölige Substanz isoliert.

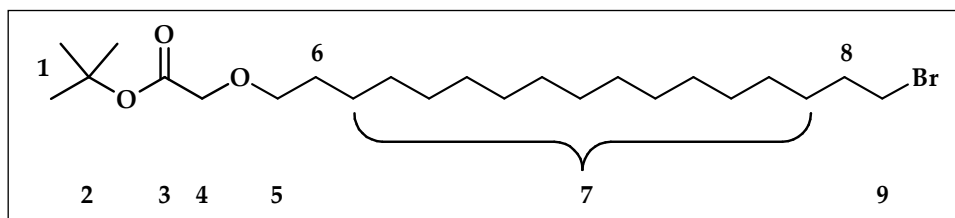
Charakterisierung:

(17-Bromo-heptadecyloxy)-essigsäure-tert-butylester

Ausbeute: $\eta=72\%$ [Literatur: 71%]

Summenformel: $C_{23}H_{45}O_3Br$

Molare Masse: 449,51 g/mol



1H -NMR (500,13 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 1,26 [m, 26H, 7-H], 1,46 [s, 9H, 1-H], 1,65 [m, 2H, 6-H], 1,82 [m, 2H, 8-H], 3,36 [t, 2H, 9-H], 3,55 [t, 2H, 5-H], 4,11 [dd, 2H, 4-H]

^{13}C -NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 29,1 [3C, 1-C], 29,8 [13C, 7-C], 30,7 [1C, 6-C], 32,9 [1C, 9-C], 34,4 [1C, 8-C], 70,1 [6C, 5-C], 72,5 [1C, 2-C], 74,2 [1C, 4-C], 169,9 [1C, 3-C]

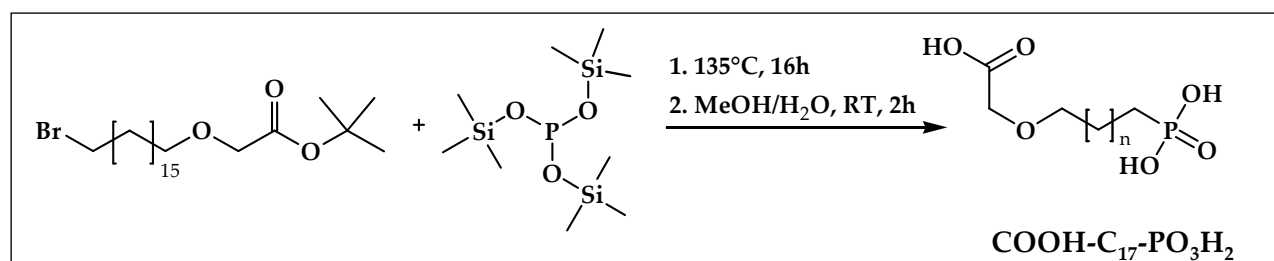
IR (KBr) ν [cm^{-1}] = 2976 [CH_3], 2925 $\nu_{as}(CH_2)$, 2856 $\nu_s(CH_2)$, 1754 $\nu(C=O)$, 1651 $\nu(C-O)$, 1460 $\delta(CH)$, 1392-1371 $\delta_s(C(CH_3)_3)$, 1123 $\nu(C-O)$, 845 $\delta_{rocking}(CH_2)$

DC: $R_f = 0,57$ (Dichlormethan/Ethylacetat/n-Hexan 5:3:2)

3.7.3 Vierte Synthesestufe: Michaelis-Arbuzov-Reaktion

Darstellung von (17-Phosphono-heptadecyloxy)-essigsäure ($COOH-C_{17}-PO_3H_2$) [108, 109]

Reaktionsgleichung:



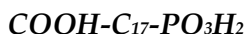
Reaktionsführung:

Die Verbindung $(CH_3)_3C-OOC-CH_2-O-(CH_2)_{17}-Br$ (5,12 mmol, 2,3 g) wird in einem 100 ml Zweihalskolben vorgelegt und unter Argonatmosphäre *tris*-Trimethylsilylphosphit (20,48

mmol, 6,1 g) zugetropft. Das Gemisch wird auf 135°C erhitzt und rührt 16h bei dieser Temperatur. Der Reaktionsfortschritt kann mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie dokumentiert werden. Bei Bedarf erfolgt eine weitere Zugabe an *tris*-Trimethylsilylphosphit (1 mmol, 0,46g). Nach einer vollständigen Umsetzung des Edukts erfolgt bei einer Temperatur von 0°C die Hydrolyse des Ansatzes mit einem Gemisch aus Methanol/Wasser (50 ml, im Verhältnis 1:1). Das Reaktionsgemenge rührt anschließend 2h bei Raumtemperatur. Während dieser Zeit ist die Bildung eines weißen Niederschlags zu beobachten. Das Hydrolysemittel wird unter Vakuum entfernt und der resultierende Feststoff, das Phosphonsäurederivat erneut in Ethylacetat (30 ml) aufgenommen. Die organische Phase wird nun mit Wasser und Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt kann zur Reinigung aus einem n-Hexan/Ethylacetat Gemisch im Verhältnis 1:1 umkristallisiert werden. Es resultiert ein farbloser Feststoff.

Charakterisierung:

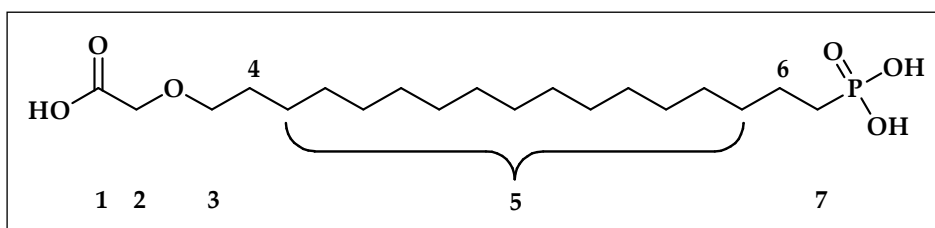
(17-Phosphono-heptadecyloxy)-essigsäure



Ausbeute: η =75% [Literatur: 81%]

Summenformel: C₁₉H₃₉O₆P

Molare Masse: 394,49 g/mol



¹H-NMR (500,13 MHz, MeOD) δ [ppm] = 1,36 [m, 26H, 5-H], 1,41 [m, 4H, 6-H und 7-H], 1,60 [m, 2H, 4-H], 3,36 [m, 2H, 3-H], 4,10 [dd, 2H, 2-H]

¹³C-NMR (75 MHz, MeOD) δ [ppm]= 21,9 [1C, 6-C], 30,3 [1C, 7-C], 30,5 [13C, 5-C], 30,9 [1C, 4-C], 69,1 [1C, 3-C], 74,8 [1C, 2-C], 172,5 [1C, 1-C]

³¹P-NMR (202,47MHz, MeOD) δ [ppm]= 30,41

IR (KBr) $\nu [cm^{-1}]$ = 3448 $\nu(OH)$, 2929 $\nu_{as}(CH_2)$, 2857 $\nu_s(CH_2)$, 2742 $\nu(P-OH)$, 1740 $\nu(C=O)$, 1643 $\nu(C-O)$, 1465 $\delta(CH)$, 1207 $\nu(P=O)$, 1143-1124 $\nu(C-O)$, 1115 $\nu_{as}(PO_3^{2-})$, 1053 $\nu(P-OH)$, 966 $\nu_s(PO_3^{2-})$, 855 $\delta_{rocking}(CH_2)$

DC: $R_f = 0$ (n-Hexan/Ethylacetat 2:1)

Elementaranalyse [%]: theoretisch: C: 57,85; H: 9,96 experimentell: C: 57,76; H: 10,10

Schmelzpunkt: 69°C

3.8 Oberflächenreaktionen

Die Durchführung von Oberflächenreaktionen an adsorbierten Monoschichten der Verbindungen **COOH-EG₃-C₁₇-PO₃H₂** sowie **NH₂-EG₃-C₁₇-PO₃H₂** erwies sich nach [48] als notwendig, um Untersuchungen zur spezifischen Proteinanbindung durchführen zu können. Dabei wurden zunächst das Adsorbat **COOH-EG₃-C₁₇-PO₃H₂** sowie Biotin in aktivierte Spezies überführt, letzteres wurde an die aminoterminierte Verbindung angebunden und anschließend die spezifische Adsorption von Proteinen, wie Poly-L-Lysin und Streptavidin [105, 110] untersucht.

Die proteinresistente Wirkung der adsorbierten Verbindungen konnte durch eine Erhöhung des Ethylenglykolanteils gesteigert werden. Eine direkte Substitution der linearen, definierten Verbindung Hexa(ethylenglykol) an den Spacer des SA-Moleküls war aufgrund der langen Alkylkette und der damit verbundenen Abnahme der Reaktivität nicht möglich. Deshalb erfolgte die Ankopplung dieser Verbindung über eine Oberflächenreaktion an die Monoschicht der Verbindung **COOH-C₁₇-PO₃H₂**. Um eine komplette resistente Wirkung gegenüber unspezifischer Proteinadsorption zu erzielen, wurde das hochverzweigte Molekül Polyglycidol eingesetzt. A. Ziegler zeigte in ihrer Diplomarbeit, dass polyglycidolterminierte Moleküle aufgrund ihrer voluminösen Endgruppe keine dicht gepackten Monoschichten auf metalloxidischen Oberflächen ausbildeten [111]. Um den Bedeckungsgrad auf der Substratoberfläche und somit die Proteinresistenz zu erhöhen, wurde zunächst das Templatmolekül **COOH-C₁₇-PO₃H₂** adsorbiert und anschließend die entsprechenden Oberflächenreaktionen zur Anbindung des Polyglycidols durchgeführt.

Die Verbindung **COOH-C₁₇-PO₃H₂** wurde für diese Versuche ausgewählt, weil sie aufgrund des langen Alkylspacers und der daraus resultierenden starken Van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen den Ketten dicht gepackte Monoschichten auf Al₂O₃ sowie TiO₂ ausbilden kann.

Zur Anbindung des hochverzweigtem Polyglycidols an die adsorbierte Spezies **COOH-C₁₇-PO₃H₂** wurden bereits in der Diplomarbeit von A. Ziegler [111] erste Vorarbeiten geleistet.

3.8.1 Spezifische Anbindung von Poly-L-Lysin an COOH-EG₃-C₁₇-PO₃H₂

Die Adsorption der Verbindung **COOH-EG₃-C₁₇-PO₃H₂** wird in Kapitel 4.3.2 detailliert beschrieben. Damit die proteinogene Aminosäure Poly-L-Lysin spezifisch und effektiv an das Substrat anbinden konnte, war eine Aktivierung der carboxylterminierten Oberfläche notwendig. (Abbildung 3-19).

Reaktionsgleichung:

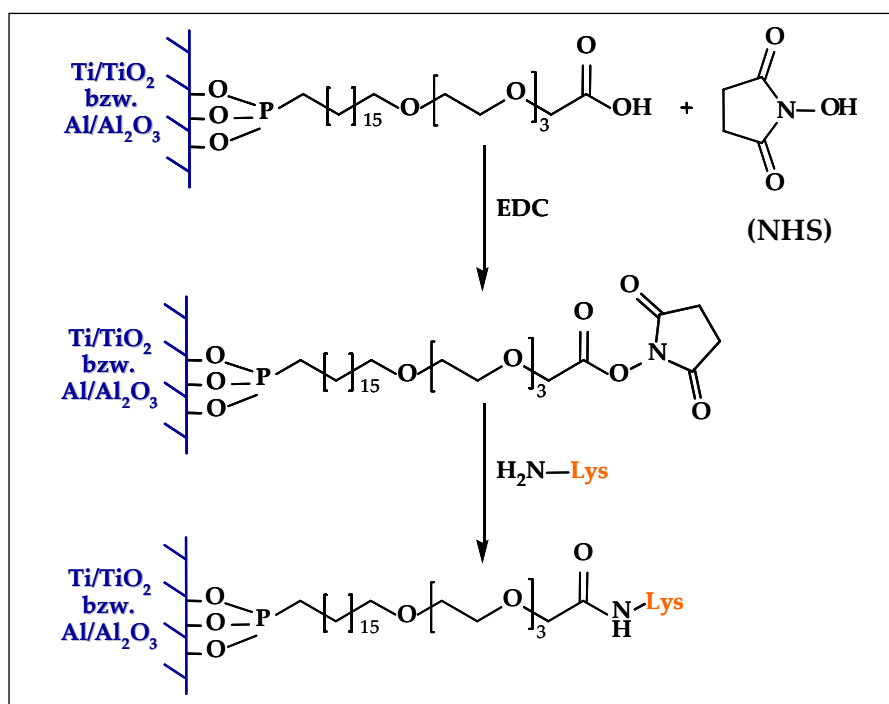


Abbildung 3-19: Darstellung des Aktivesters von **COOH-EG₃-C₁₇-PO₃H₂** mit anschließender Anbindung von Poly-L-Lysin

Reaktionsführung:

Es wird ein Gemisch (1:1) aus EDC (0,4 M) und NHS (0,1 M) in bidestilliertem Wasser hergestellt. Das Substrat wird 45min in dieser Lösung ausgelagert, nach der Entnahme

gründlich mit bidestilliertem Wasser gewaschen und anschließend im Stickstoff-Strom getrocknet.

An die aktivierte Spezies konnte nun das Protein Poly-L-Lysin (100 µg/100 ml) über die Ausbildung einer Peptidbindung an der Oberfläche nach Kapitel 4.3.2 immobilisiert werden.

Charakterisierung:

Mittels SPR-Spektroskopie konnte die Kinetik dieses Versuchs verfolgt und aufgrund der Lage der Minima der Plasmonenresonanz eine Aussage über die Anbindung getroffen werden.

3.8.2 Spezifische Anbindung von Streptavidin an $\text{NH}_2\text{-EG}_3\text{-C}_{17}\text{-PO}_3\text{H}_2$

Die Adsorption der Verbindung $\text{NH}_2\text{-EG}_3\text{-C}_{17}\text{-PO}_3\text{H}_2$ erfolgte nach Kapitel 4.3.2. An die Monoschicht wurde anschließend über eine Oberflächenreaktion Biotin (Abbildung 3-20) kovalent angebunden, um gezielt Streptavidin zu immobilisieren.

Reaktionsgleichung:

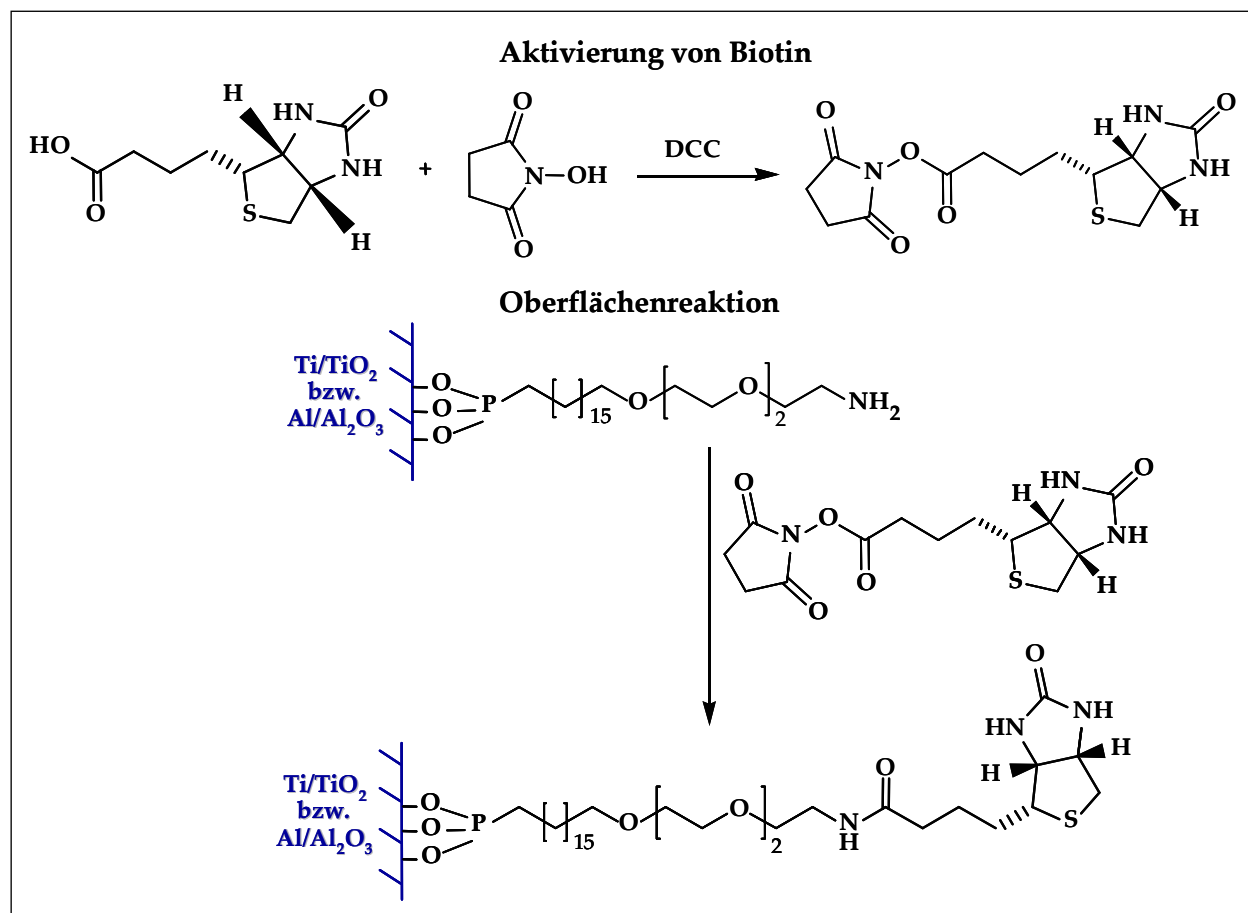


Abbildung 3-20: Schema zur Aktivierung von Biotin mit anschließender Anbindung an die Monoschicht der Verbindung $\text{NH}_2\text{-EG}_3\text{-C}_{17}\text{-PO}_3\text{H}_2$

Reaktionsführung:

Es wird eine Biotin-Lösung (0,1 M in trockenem DMF) unter Eiskühlung tropfenweise mit einem Gemisch (1:1) aus NHS (0,1 M) und DCC (0,1M) in trockenem DMF unter Rühren versetzt. Das Gemisch rührt weitere 4h zunächst bei 0°C und wird während dieser Zeit langsam auf 25°C erwärmt.

Das biotinhaltige Reaktionsgemisch wird durch einen Spritzenfilter (Porengröße 2µm) auf die NH₂-terminierte Substratoberfläche für eine Reaktionszeit von 3h gegeben und durch anschließendes gründliches Spülen mit DMF und bidestilliertem Wasser steht das Substrat für eine Streptavidinanbindung (100 µg/ 100 ml) zur Verfügung (siehe Kapitel 4.3.2).

Charakterisierung:

Die Kinetik bzw. der Erfolg der Anbindung von Biotin an die Oberfläche wurde mittels SPR-Spektroskopie sowie der winkelabhängigen XPS untersucht. Die Kinetik der Immobilisierung von Streptavidin am Substrat konnte ebenfalls mit der SPR-Spektroskopie verfolgt werden.

3.8.3 Anbindung von Hexa(ethylenglykol) und hochverzweigtem Polyglycidol an eine COOH-C₁₇-PO₃H₂ Monoschicht über Oberflächenreaktionen

Eine direkte Substitution der linearen, definierten Verbindung Hexa(ethylenglykol) (HEG) an den Spacer des SA-Moleküls war aufgrund der langen Alkylkette und der damit verbundenen Abnahme der Reaktivität nicht möglich. Deshalb erfolgte die Ankopplung dieser Verbindung über eine Oberflächenreaktion an die dicht gepackte Monoschicht der Verbindung **COOH-C₁₇-PO₃H₂**. Bei HEG handelt es sich, wie auch beim Tri(ethylenglykol) um ein lineares Molekül mit einer definierten Kettenlänge. Desweiteren wurde hochverzweigtes Polyglycidol (HPG) an die Monoschicht des Templatmoleküls angebunden, um proteinresistente Oberflächen zu erzeugen. HPG besitzt eine molare Masse von 2500 g/mol und eine Molekulargewichtsverteilung (Polydispersität) von 1,54. Diese Verbindung wurde von der Firma HyperPolymers GmbH in Freiburg zur Verfügung gestellt. Die Substanz besitzt eine Polyetherstruktur, bei der jedes Verzweigungsende eine Hydroxygruppe trägt und somit ein hoch funktionelles Material aber aufgrund seines hohen Verzweigungsgrades hinsichtlich seiner Struktur kein definiertes Molekül darstellt. Aus der Literatur ist bekannt, dass beide Substanzen

in Verbindung mit Alkanthiolen immobilisiert auf Goldoberflächen zu einer effektiven Steigerung der Resistenz gegenüber unspezifischer Proteinadsorption beitragen [46, 112]. In der vorliegenden Arbeit sollen diese Erfahrungen auf mit Alkylphosphonsäurederivate modifizierte TiO₂-Oberflächen übertragen werden.

3.8.3.1 Anbindung von Hexa(ethylenglykol)

Reaktionsgleichung:

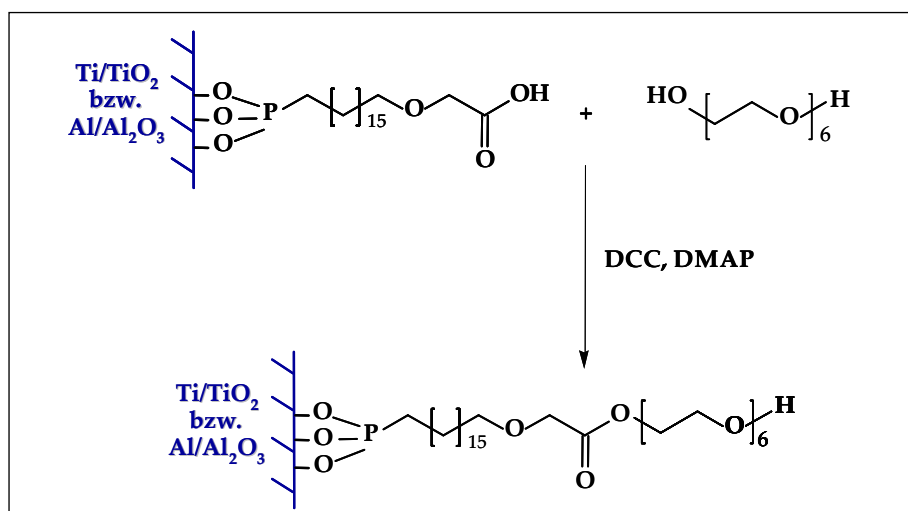


Abbildung 3-21: Schematische Darstellung der Anbindung von HEG an die Monoschicht der Verbindung COOH-C₁₇-PO₃H₂

Reaktionsführung:

HEG wird unter Vakuum getrocknet und (0,5 mmol, 0,170 g) in trockenem DMF (4 ml) gelöst. Der Lösung werden eine katalytische Menge DMAP und DCC (0,5 mmol, 0,103 g) zugegeben. Das modifizierte Substrat wird für 24h in dem Gemisch ausgelagert. Nach Ablauf der Reaktionszeit erfolgt ein gründliches Spülen des Substrates mit DMF und anschließend mit bidestilliertem Wasser. Die modifizierte Oberfläche steht nun einem Proteintest mit BSA (100 µg/ 100 ml) zur Verfügung.

Charakterisierung:

Die Anbindung von HEG an die COOH-terminierte Oberfläche konnte mittels der SPR-Spektroskopie sowie XPS nachgewiesen werden. Die Kinetik des anschließenden Proteinadsorptionsversuches wurde mit der SPR-Spektroskopie verfolgt.

3.8.3.2 Anbindung von hochverzweigtem Polyglycidol

Reaktionsgleichung:

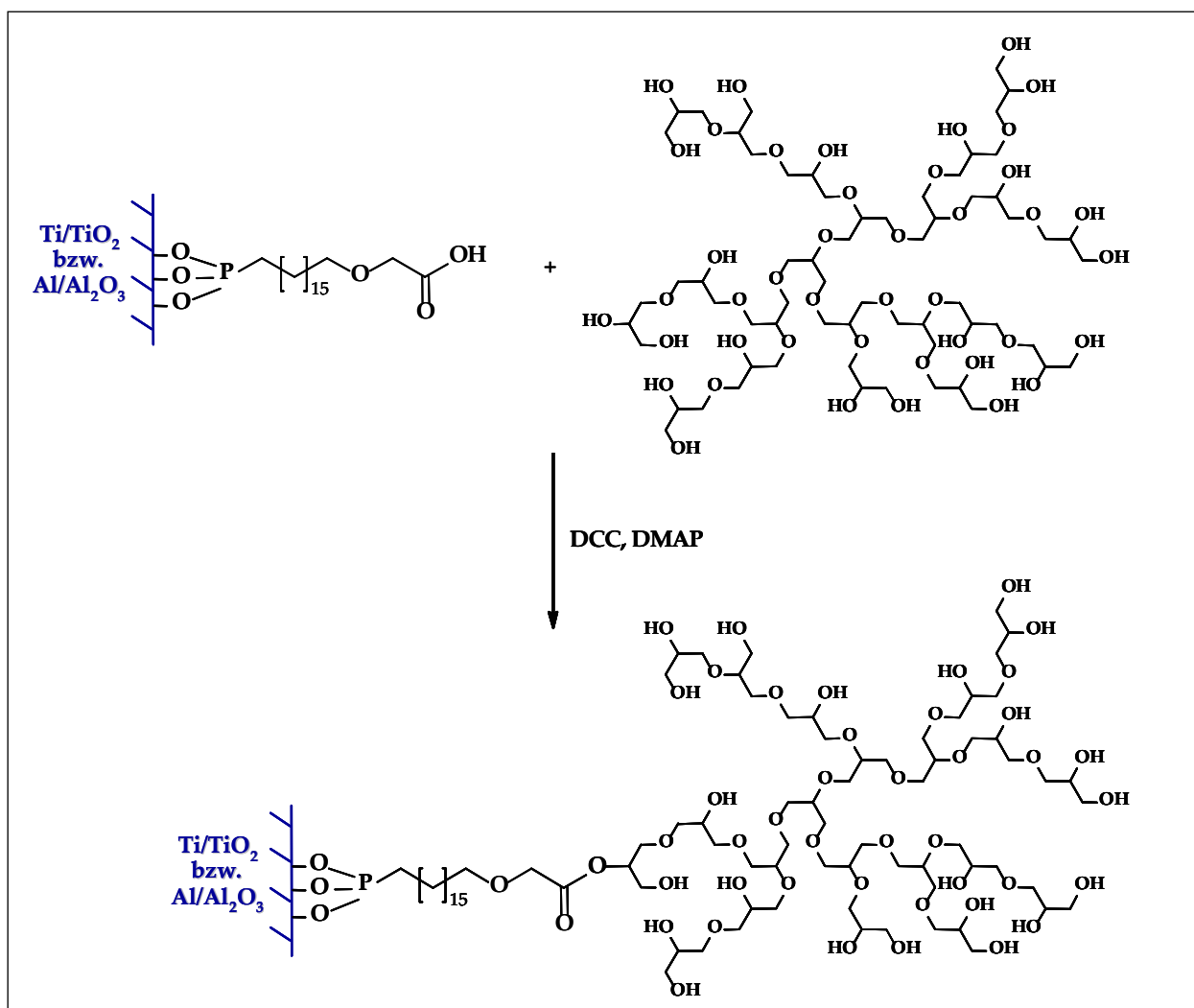


Abbildung 3-22: Schematische Darstellung zur Anbindung von HPG an die Monoschicht der Verbindung $\text{COOH-C}_{17}\text{-PO}_3\text{H}_2$

Reaktionsführung:

Es wird zunächst HPG (0,15 mmol, 0,35 g) im Vakuum bei 100°C getrocknet (Masseverlust von 13 mg) und anschließend in trockenem DMF (1 ml) gelöst. Der Lösung werden eine katalytische Menge DMAP und DCC (0,38 mmol, 0,077 g) zugegeben. Das modifizierte Substrat wird für 24h in dem Gemisch ausgelagert. Nach Ablauf der Reaktionszeit erfolgt ein gründliches Spülen des Substrates mit DMF und anschließend mit bidestilliertem Wasser.

Die modifizierten Oberflächen wurden für Untersuchungen mit den Proteinen BSA, Fibrinogen und Hämoglobin (je 100 µg/ 100 ml) vorgesehen.

Charakterisierung:

Die Anbindung von hochverzweigtem Polyglycidol an die COOH-terminierte Oberfläche konnten ebenfalls mittels der SPR-Spektroskopie und XPS untersucht werden. Die Kinetik der nachfolgenden Proteintests wurde mit der SPR-Spektroskopie verfolgt.

4. Oberflächenmodifikation: Materialien, Protokolle, Charakterisierungsmethoden

4.1 Substrate

Unterschiedliche metalloxidische Substrate wurden in der vorliegenden Arbeit mit Monoalkylphosphorsäure- und Alkylphosphonsäurederivaten modifiziert, um das Schichtbildungsverhalten der SA-fähigen Moleküle, die Dicke der erzeugten Monoschichten, die Orientierung und Stabilität der Schichten, die Durchführung von Oberflächenreaktionen sowie das Verhalten gegenüber Proteinen zu untersuchen. Es wurden die folgenden Substrate verwendet: $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$, LaSFN9-Glas/Au/ Al_2O_3 ; LaSFN9-Glas/Au/ TiO_2 sowie strukturierte Substrate $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$.

4.1.1 Aluminiumoxidsubstrate

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zusätzlich zu den Titandioxid- auch Aluminiumoxid-oberflächen hauptsächlich für SPR-Messungen verwendet. Dazu war es erforderlich, spezielle hochbrechende LaSFN9-Gläsern ($n_{20}^D = 1,8449$) zunächst mit 45 nm Gold und anschließend mit 2,5 nm Aluminium, welches an Luft eine natürliche Oxidschicht ausbildet, zu bedampfen. Die Beschichtung der Substrate für die SPR-Spektroskopie wurden mit Gold (DEGUSSA Feingold, 9999/10000) und Aluminium (Chempur, 99,999%) in einer Bedampfungsanlage von Malz & Schmidt, Modell B30.3-T durchgeführt. Im Rezipienten der Anlage sind zwei unabhängige Verdampfer eingebaut, welche abwechselnd mit einer Blende abgedeckt werden können und somit ein aufeinander folgendes Aufdampfen von zwei Metallen in einem Arbeitsgang möglich ist. Es wurde ein Substraträger mit sechs gereinigten Glassubstraten bestückt und in den Rezipienten eingebaut. Nachdem der Rezipient mit Hilfe einer Drehschieberpumpe auf ein

Vorvakuum kleiner $5 \cdot 10^{-2}$ mbar evakuiert wurde, erfolgte die Zuschaltung der Turbomolekularpumpe (LEYBOLD TURBOVAC 600C) über ein Programmventil. Bei einem Vakuum kleiner $8,0 \cdot 10^{-6}$ mbar wurden zunächst 45 nm Gold aus einem Verdampferschiffchen und anschließend 2,5 nm Aluminium aus einer Verdampferwendel auf die Glasträger aufgedampft. Der Rezipient konnte anschließend mit Stickstoff belüftet und die Substrate ausgebaut werden. Die Beschichtung der LaSFN9-Gläser erfolgte am Institut für Physikalische Chemie der TU Dresden. Mit Hilfe von AFM-Messungen wurde die Oberflächenrauigkeit dieser Substrate bestimmt.

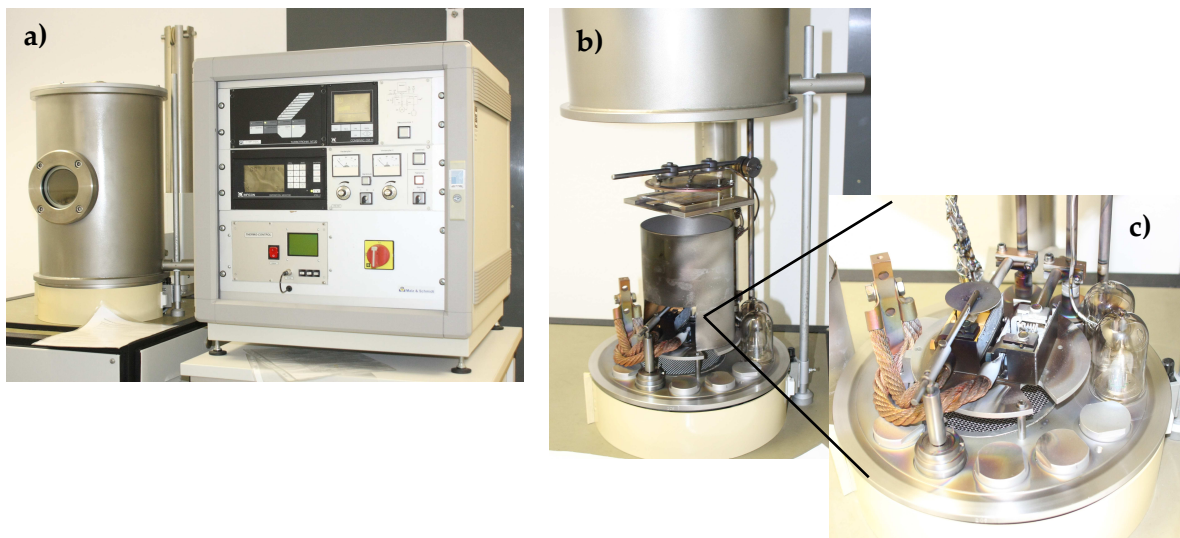


Abbildung 4-1: a) Bedampfungsanlage von Malz & Schmidt; b) Rezipient; c) Anordnung der beiden Verdampfer

4.1.2 Titandioxidsubstrate

Substrate mit glatten Oberflächen sind wichtige Modelloberflächen, um Adsorptionsversuche mit Verbindungen, deren Größen im Bereich von 2-3 nm liegen, durchführen und charakterisieren zu können. So ist das Verhältnis von Rauigkeit der Oberfläche zur Länge des adsorbierten Moleküls von maßgeblicher Bedeutung für die lokale Ordnung der Moleküle auf der Oberfläche. Hinsichtlich einer zukünftigen Anwendung sind glatte, polierte Titansubstrate, die mit einer natürlich amorphen Dioxidschicht überzogen sind, eine nahe liegende Wahl. Die Herstellung von flachen, homogenen und glatten Substraten ist sehr zeitaufwändig und verlangt einen hohen Grad an metallographischen Erfahrungen. Aus diesem Grund wurden alternativ Siliziumwafer oder Glassubstrate mit einer Oberflächenrauigkeit kleiner als 10 nm gewählt. Die in dieser Arbeit verwendeten Titandioxidsubstrate wurden mit dem DC-

Magnetron (der Fa. Leybold Z600) Sputterverfahren im Paul Scherrer Institut (PSI, Villigen, Schweiz) dargestellt. Titandioxid wurde sowohl auf Siliziumwafer, als auch auf mit Gold bedampfte Glasträger (LaSFN9-Glas) abgeschieden (Abbildung 4-2).

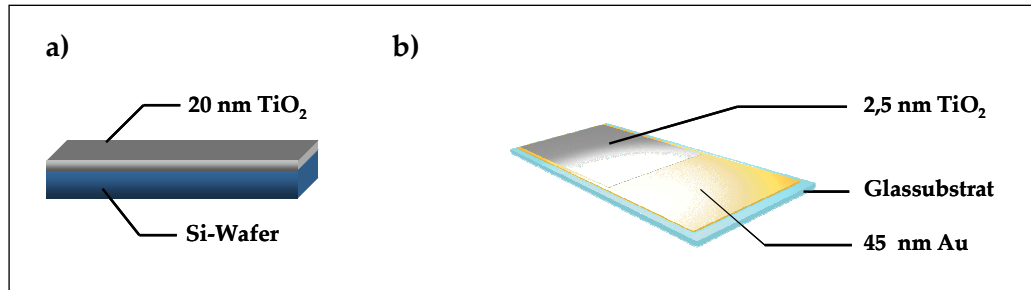


Abbildung 4-2: Darstellung von verschiedenen Substraten, die mit TiO₂ bedampft wurden; a) Siliziumwafer mit 20 nm TiO₂; b) Glassubstrat (LaSFN9) bedampft mit 45 nm Gold und 2,5 nm TiO₂

Die Goldbeschichtung des Glasträgers (Degussa Feingold, 9999/10000) wurde am Institut für Physikalische Chemie der TU Dresden in einer Bedampfungsanlage von Malz & Schmidt, Modell B30.3-T (Abbildung 4-1) durchgeführt. Die Titandioxidbeschichtung fand, wie oben beschrieben, am Paul Scherrer Institut statt.

Die Oberflächenbeschaffenheit, d.h. die Oberflächenrauigkeitsparameter, R_a und R_q (Kapitel 4.4.3), der unterschiedlichen Substrate wurden über Atom-Kraft-Mikroskopie-Messungen (AFM) bestimmt und sind im Kapitel 5.2 dargestellt. Die AFM-Messungen wurden am Institut für Halbleiter-und Mikrosystemtechnik der TU Dresden durchgeführt.

4.1.3 Strukturierte Oberflächen

Bei den strukturierten Substraten, die im Verlauf dieser Arbeit zur Anwendung kamen, handelt es sich um kleine quadratische Titandioxidflächen auf einer Siliziumdioxidoberfläche als Untergrund (siehe Kapitel 2.4.1). Die Strukturen liegen in einem Größenbereich von 60x60 μm . Die Fotolithografie zur Erzeugung der TiO₂-Strukturen (siehe Abbildung 4-3) wurde am Institut für Oberflächentechnik der ETH Zürich durchgeführt.

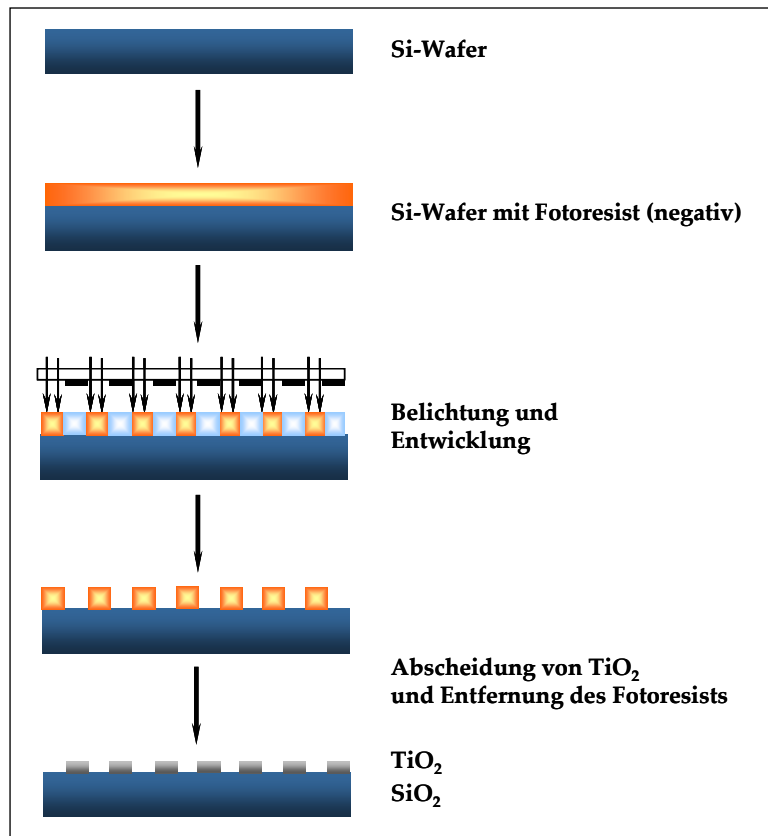


Abbildung 4-3: Schema zur Strukturierung von Oxidschichten durch Fotolithografie, Ausgangspunkt bildet ein Si-Wafer (oben); Aufbringen des Fotoresists und Entwicklung (mitte); TiO_2 -Abscheidung und Entfernung des Resists (unten) [113]

Die Fotolithografie ist ein Verfahren, bei dem ein lichtempfindlicher Film (Fotolack oder Fotoresist) durch eine Maske belichtet wird und somit Strukturen auf einer Metalloxydoberfläche erzeugt werden [113]. Dabei werden Strukturinformationen von einer sogenannten Fotomaske in einen Fotoresist mit Hilfe der Lithografie (z.B. durch UV-Licht) übertragen. Der Fotoresist selbst wird vorher durch Spin-coating auf die planare Substratoberfläche aufgebracht, um homogene und definierte Schichtdicken zu erzeugen. Um Strukturen im Mikro- und Nanometerbereich herstellen zu können, wird der Fotoresist mit UV-Strahlung definierter Wellenlänge bestrahlt, wobei er entweder vernetzt und erhärtet (Negativresist) oder degeneriert und somit löslich wird (Positivresist). Das heißt, bei der Verwendung eines positiven Fotoresistes verbleibt der Bereich auf der Oberfläche, der durch die Maske nicht belichtet wird, bei einem Negativresist, der Bereich, der belichtet wird. Nach der Entwicklung des latenten Bildes kann die Strukturinformation in eine darunter liegende Schicht übertragen werden. Für die Strukturübertragung gibt es zwei Möglichkeiten:

1. additive Methoden, bei denen Material in den Bereichen deponiert wird, in denen beim Entwickeln der Fotolack entfernt wurde (Abbildung 4-3; Abscheidung von TiO_2), und

2. subtraktive Methoden, bei denen Material in diesen Bereichen entfernt wird (z.B. durch Ätzen).

Nach der Entfernung des Fotoresist verbleiben schließlich die gewünschten metalloxidischen Strukturen auf der Oberfläche [114].

Zur Ermittlung der Oberflächenbeschaffenheit der strukturierten Substrate wurden AFM-Messungen sowie Aufnahmen mit einem Polarisationsmikroskop durchgeführt. Die Polarisationsmikroskopie im DIC-Modus wurden am IPF Dresden und die AFM-Messungen an der Professur für Anorganische Chemie der TU Dresden durchgeführt.

4.2 Lösungsmittel, Chemikalien, Puffer

4.2.1 Lösungsmittel, Chemikalien

Für die Adsorptions- und Proteinversuche wurden die in den folgenden Tabellen aufgeführten Lösungsmittel und Chemikalien verwendet. Der analytische Reinheitsgrad dieser Substanzen ist essentiell bezüglich Oberflächenreinheit und -qualität.

Tabelle 4-1: Lösungsmittel für Adsorptionsuntersuchungen

Lösungsmittel	Hersteller	Reinheit	Verwendung
Aceton		analytisch rein, destilliert	Reinigungsprozess
Ethanol	Fisher Scientific	absolut, analyt. reag. grade, 99,99%	Adsorptionsmedium
n-Methylpyrrolidon	Aldrich	wasserfrei, 99,5%	Reinigungsprozess
<i>iso</i> -Propanol	Chromanorm®	for HPLC	Reinigungsprozess
Toluol		analytisch rein, destilliert	Reinigungsprozess
Wasser		bidestilliert oder Millipore	Reinigungsprozess, Adsorptionsmedium
Wasserstoffperoxid	J.T. Baker	30%ig, p.a.	Reinigungsprozess
Schwefelsäure	Merck	95 – 97%	Reinigungsprozess

4.2.2 SA-Moleküle

Die in dieser Arbeit dargestellten SA-fähigen Moleküle (siehe Kapitel 3) wurden auf metalloxidischen Oberflächen, wie Titandioxid und Aluminiumoxid adsorbiert. Als Referenzsubstanz diente die Verbindung Octadecylphosphonsäure (OPA).

Für die zur Durchführung des Adsorptionsprozesses benötigten Lösungen wurde eine Konzentration von $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l gewählt. Generell sollten die Konzentrationen der Adsorptionslösungen in der Nähe der Kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC) der betreffenden Verbindung liegen. Außerdem sollte die Konzentration der Lösung so hoch sein, dass eine vollständige Bedeckung des Substrates mit den SA-Molekülen gewährleistet ist. Die Messung der CMC erfolgte am Tensiometer K12 der Fa. KRÜSS INSTRUMENTS, Hamburg.

Für die kurzkettigen Verbindungen konnte Wasser als Lösungsmittel verwendet werden. Die langkettigen Verbindungen und OPA wurden aufgrund der schlechten Löslichkeit in Wasser bei 20°C, in einem Ethanol/Wasser-Gemisch im Verhältnis 1:1 gelöst. Die bifunktionalen Haftvermittler mit den terminalen Aminogruppen bildeten innere Salze und waren nur nach Säurezugabe wasserlöslich.

Als Lösungsmittel zur Herstellung der entsprechenden Adsorptionslösungen wurde Wasser bzw. eine Gemisch aus Ethanol/Wasser gewählt, da es sich dabei um gute Lösemittel für die zu adsorbierenden Spezies sowie um ungiftige, unbedenkliche Stoffe in Hinsicht auf Proteintests handelt (siehe Kapitel 5.1.1).

Alle Substanzen sowie Informationen über die entsprechenden Adsorptionslösungen sind in der nachfolgenden Tabelle aufgezeigt. Die Adsorptionslösungen wurden bei 7°C gelagert und vor Gebrauch über einen Spritzenfilter (0,2 µm, Sigma-Aldrich) gegeben.

Tabelle 4-2: SA-Moleküle

Verbindung (Abkürzungen)	Molare Masse [g/mol]	Adsorptionslösung	
		Konzentration [mol/l]	Lösungsmittel
COOH-EG ₃ -C ₁₁ -PO ₄ H ₂	458,49	1·10 ⁻³	Wasser
COOH-EG ₃ -C ₁₇ -PO ₄ H ₂	542,65	1·10 ⁻³	Wasser/Ethanol 1:1
COOH-EG ₃ -C ₁₁ -PO ₃ H ₂	442,49	1·10 ⁻³	Wasser
COOH-EG ₃ -C ₁₇ -PO ₃ H ₂	526,65	1·10 ⁻³	Wasser/Ethanol 1:1
NH ₂ -EG ₃ -C ₁₁ -PO ₃ H ₂	383,47	1·10 ⁻³	Wasser (ansäuern mit HCl bis pH4)
NH ₂ -EG ₃ -C ₁₇ -PO ₃ H ₂	467,63	1·10 ⁻³	Wasser/Ethanol 1:1 (ansäuern mit HCl bis pH4)
COOH-C ₁₇ -PO ₃ H ₂	394,49	1·10 ⁻³	Wasser/Ethanol 1:1
C ₁₈ -PO ₃ H ₂ (OPA)	334,47	1·10 ⁻³	Wasser/Ethanol 1:1

4.2.3 Puffer

Da Proteinadsorptionen von der Protonenkonzentration abhängig sind, erwies es sich als sehr wichtig, diese Versuche bei einem definierten pH-Wert durchzuführen. Damit der pH-Wert der Lösung stabil blieb und keine unerwünschten Effekte in der Adsorptionskinetik oder Instabilitäten in der Monoschicht auftraten, zum Beispiel durch das Lösen von Kohlenstoffdioxid, erfolgte der Einsatz von Pufferlösungen. In dieser Arbeit wurden drei verschiedene Puffersysteme bei pH 7,4 verwendet: phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES2) und Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris). Diese Substanzen gehören zu den Standardpuffersystemen für biologische Anwendungen.

Die aufgeführten Puffer und die dazugehörigen Herstellungsvorschriften sind in Tabelle 4-3 zusammengefasst. Alle Puffersysteme wurden mit bidestilliertem Wasser hergestellt, bei 7°C gelagert und vor Gebrauch über einen Spritzenfilter (0,2 µm, Sigma-Aldrich) gegeben.

Tabelle 4-3: Puffer für Stabilitätstests und Proteinversuche

Reagenzien	Hersteller	Vorschrift
HEPES2 $\text{HO} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{N} \begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ \diagdown \quad \diagup \end{array} \text{N} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{SO}_3\text{Na}$	Sigma-Aldrich	10 mmol/l Hepes, 150 mmol/l NaCl, 4,65 mmol/l NaOH (pH 7,4 bei 25°C)
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{KH}_2\text{HPO}_4 / \text{NaCl}$	Fluka	137 mmol/l NaCl, 2,7 mmol/l KCl und 10 mmol/l Phosphat Puffer (pH 7,4 bei 25°C)
Trizma®base (Tris) $\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{OH} \\ \\ \text{H}_2\text{N} - \text{C} - \text{CH}_2 - \text{OH} / \text{HCl} \\ \\ \text{CH}_2 - \text{OH} \end{array}$	Sigma	99,9%, 50 mmol/l Tris Puffer (pH 7,4 bei 25°C)

4.2.4 Proteine

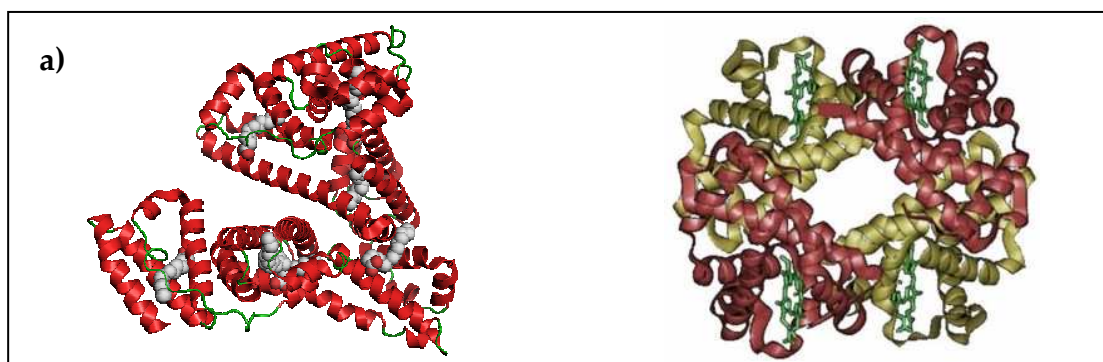
Die Testung der Proteinresistenz bzw. der spezifischen Anbindung von Proteinen an die modifizierten Oberflächen erfolgte mit den in Tabelle 4-4 aufgeführten Proteinen. Alle Versuche wurden in den unter Kapitel 4.2.3 aufgeführten Puffersystem HEPES2 bei einem physiologischen pH-Wert von 7,4 durchgeführt. Dieser natürliche pH-Wert wurde gewählt, um möglichst die Rahmenbedingungen für Proteine zu schaffen, wie sie auch im normalen Organismus vorliegen. Die verschiedenen Proteine wurden in HEPES2 (1 ml) gelöst, aliquotiert (20 µg/20 µl) und anschließend bei -18°C gelagert. Die Gesamtkonzentrationen der Proteinlösungen sind in Tabelle 4-4 aufgeführt. Vor dem Proteinversuch wurde das modifizierte metalloxidische Substrat für 2h in HEPES2 equilibriert und anschließend 20 min der Proteinlösung ausgesetzt. Proteinadsorptionen verlaufen spontan an organischen Oberflächen innerhalb der ersten Minuten, weshalb für unspezifische Adsorptionstests diese Zeit ausreichend ist. Nach dieser Auslagerungszeit wurden die Substrate gründlich mit Pufferlösung und Wasser gespült.

Tabelle 4-4: Proteine

Reagenzien	Hersteller	Vermerk
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich	≥96%, 100 µg/ 100 ml
Biotin	Sigma	~99%
Fibrinogen	Sigma-Aldrich	Typ IV: aus dem Rinderplasma, 100 µg/ 100 ml
Hämoglobin	Sigma	aus Rinderblut, 100 µg/ 100 ml
Lysozym	AppliChem	aus dem Hühnereiweiß, 100 µg/ 100 ml
Poly-L-Lysin	Sigma	0,01%ige Lösung
Vollständiges Menschliches Serum (FHS)	Precinorm®U, Roche	100 µg/ 100 ml
Streptavidin	AppliChem	ultra rein, 100 µg/ 100 ml

Serumalbumine (Rinderserumalbumin (BSA))

Als Albumine wird eine Gruppe einfacher, niedermolekularer, wasserlöslicher und gut kristallisierbarer saurer Proteine bezeichnet. Sie gehören zur Gruppe der globulären Proteine, die vorwiegend in Körperflüssigkeiten und Geweben vorkommen. Albumin fungiert im menschlichen Organismus vor allem Reserveprotein und als Trägerprotein. Menschliches Serumalbumin besteht aus einer Polypeptidkette von 579 Aminosäuren, deren Raumstruktur durch 17 Disulfidbrücken stabilisiert wird. Der IEP liegt bei 4,7 - 4,9. Albumine sind aufgrund ihrer hydrophilen Oberfläche sehr gut in Wasser löslich, haben eine relativ niedrige molare Masse von 67,5 kDa und wirken amphoter, d.h. sie können sowohl Kationen als auch Anionen reversibel binden [115].

**Abbildung 4-4:** Molekülstruktur von a) Serumalbumin; b) Hämoglobin [115]

Hämoglobin (Hb)

Als Hämoglobin wird der eisenhaltige rote Blutfarbstoff in den roten Blutkörperchen bezeichnet, der Sauerstoff von der Lunge in die Gewebe transportiert. Es tritt als Tetramer auf, besitzt eine Molekularmasse von 68 kDa und enthält 4 Hämgruppen (Abbildung 4-4 (b)). Hämoglobin enthält ungefähr zwei Drittel des Gesamtkörpereisens. Der IEP liegt bei 7,4. Das Hämoglobinmolekül ändert seine Konformation durch Oxigenierung. Dabei wird zwischen dem R-Zustand des Oxihämoglobins mit hoher Sauerstoffaffinität und dem T-Zustand des Desoxihämoglobins mit einer bedeutend geringeren Sauerstoffaffinität unterschieden. Das Protein Hämoglobin ist aus zwei alpha- und zwei beta-Untereinheiten (Polypeptidketten) aufgebaut. Jede Untereinheit beinhaltet eine Hämgruppe, die ein Eisen (II)-Ion enthält, das wiederum ein Sauerstoffmolekül binden kann [115].

Fibrinogen

Fibrinogen ist ein Glykoprotein, das in der Leber gebildet wird. Fibrinogen, welches als Gerinnungsfaktor Nummer eins zu 3 – 4% im Blutplasma enthalten ist, wird im Verlauf der Blutgerinnung in das unlösliche polymere Proteingel Fibrin durch das Enzym Thrombin umgewandelt. Die Plasma- und Gewebefaktoren (Integrin) wirken auf das Fibrinogen ein, so dass es Ketten bildet und die Wunde verschließt. Fibrinogen ist ein lösliches Protein mit einem Molekulargewicht von 340 kDa. Es ist aus zwei symmetrischen Halbmolekülen zusammengesetzt und wird jeweils aus drei Paaren nicht identischer Polypeptidketten gebildet. Der IEP liegt bei 5,5 – 5,8 [116].

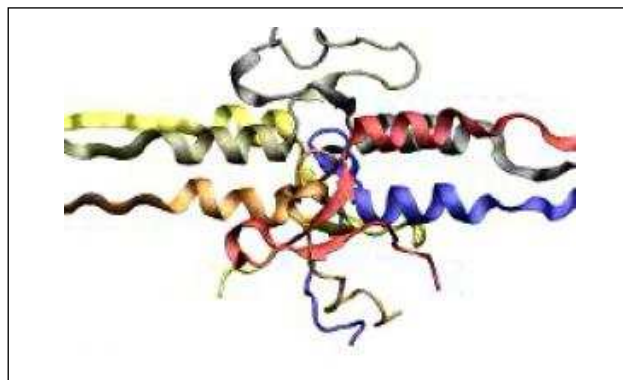


Abbildung 4-5: Struktur von Fibrinogenmolekülen [117]

Lysozym

Lysozym, auch Muramidase genannt, ist ein zum Beispiel in Speichel, Tränen sowie Nasen- und Darmschleimhäuten, aber auch im Blutplasma vorkommendes Enzym, das gegen Bakterien wirkt, indem es deren Zellwand abbaut. Es ist wichtig für die Abwehr bakterieller Infektionen. Lysozym besteht aus 129 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 15 kDa. Der IEP liegt bei 11. Lysozym weist eine globuläre Struktur auf, die aus fünf α -Helices und fünf β -Faltblättern aufgebaut ist und vier Disulfidbrücken besitzt (Abbildung 4-6) [118].

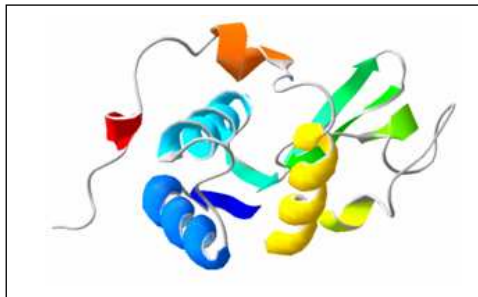


Abbildung 4-6: Molekülstruktur von Lysozym

Biotin

Biotin ist das zur Gruppe der B-Vitamine gehörige wasserlösliche Vitamin H. Es fungiert im Körper als prosthetische Gruppe von Carboxylasen, ist demzufolge an das jeweilige Enzym kovalent gebunden und dient der vorübergehenden Bindung einer Carboxylgruppe vor der Übertragung auf das Zielmolekül. Biotin wurde in dieser Arbeit über eine Oberflächenreaktion kovalent an die immobilisierte Monoschicht der Verbindung $\text{NH}_2\text{-EG}_3\text{-C}_{17}\text{-PO}_3\text{H}_2$ gebunden (Kapitel 3.8.2) [119].

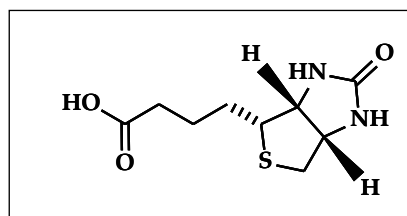


Abbildung 4-7: Struktur von Biotin

Streptavidin

Streptavidin ist ein aus vier identischen Untereinheiten aufgebautes Protein (Tetramer). Jede dieser Untereinheit kann mit sehr hoher Affinität ein Biotinmolekül binden ($K_a \sim 10^{14} - 10^{15} \text{ M}^{-1}$). Diese Bindung zählt zu den stärksten nicht kovalenten biologischen Bindungen. Der IEP von Streptavidin liegt im neutralen Bereich (7,0). Aufgrund seiner geringen Gesamtladung und der Tatsache, dass Streptavidin kein Glykoprotein ist und deshalb nicht an Kohlenhydratrezeptoren bindet, sind unspezifische Bindungen in Streptavidin-Systemen eher selten. Jede der vier Untereinheiten ist aus 159 Aminosäuren aufgebaut und besitzt ein Molekulargewicht von 16,8 kDa [85, 120].

Poly-L-Lysin (PLL)

Poly-L-Lysin ist eine essentielle proteinogene Aminosäure. Es gehört der Gruppe der basischen Aminosäuren oder Hexonbasen an. Poly-L-Lysin besitzt basische Gruppen sowie eine freie Aminogruppe, die sich in der Seitenkette befindet. Es wird häufig bei Zellversuchen als Substrat für Zellkulturen in der Biochemie verwendet und bietet sich deshalb hinsichtlich der Zielstellung dieser Arbeit zur spezifischen Anbindung an modifizierten Metalloxiden an. Das Molekulargewicht des verwendeten PLL liegt zwischen 70 und 150 kDa [121].

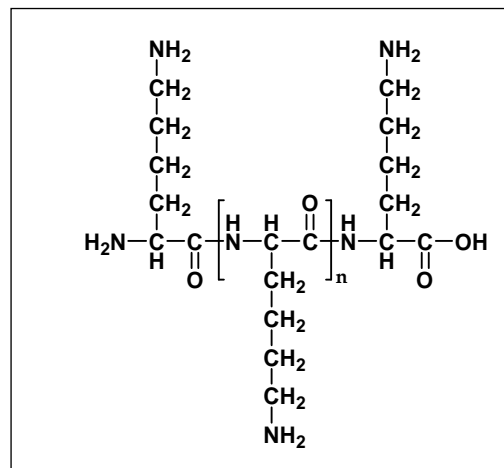


Abbildung 4-8: Struktur von Poly-L-Lysin

Vollständiges Menschliches Serum (FHS)

Das „full human serum“ beinhaltet das gesamte Spektrum an Proteinen des menschlichen Blutes außer Hämoglobin.

4.3 Protokolle zur Oberflächenmodifikation

Die Oberflächenmodifikation wurde immer nach einem Standardregime durchgeführt, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Abbildung 4-9 zeigt eine generelle Prozedur zur Adsorption von SA-fähigen Molekülen auf metalloxidischen Oberflächen. Nach der Entfernung von mikroskopischen und makroskopischen Kontaminationen durch eine nasschemische Reinigung im Ultraschall, wurden die Oberflächen durch eine UV/Ozon Behandlung aktiviert und schließlich die Amphiphile aus Lösung adsorbiert. Nach beendeter Adsorption erfolgte durch gründliches Spülen der Oberfläche mit Lösungsmittel oder Puffer, die Entfernung physisorbierter Moleküle, um eine homogene Monoschicht zu erhalten.

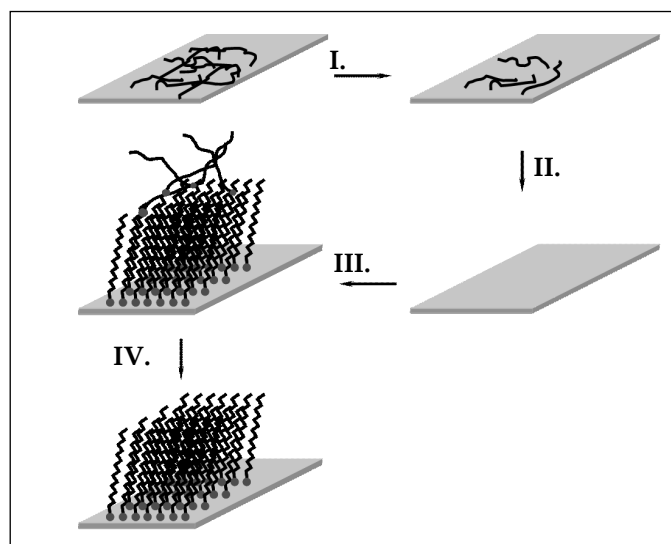


Abbildung 4-9: Schematische Darstellung des Adsorptionsprozesses; I. Ultraschallbehandlung des Substrates in Toluol und iso-Propanol zur Reinigung; II. UV/Ozon oder Plasma Behandlung zur Reinigung und Aktivierung der Oberfläche; III. 16h Adsorption der SA-Moleküle; IV. Spülen des Substrates nach der Adsorption mit Lösungsmittel; Resultat: eine definierte Monoschicht

4.3.1 Protokolle zur Glas- und Substratreinigung

4.3.1.1 Glasreinigung

Alle die zu Adsorptionsversuchen benötigten Glasgeräte wurden, um organische und anorganische Kontaminationen zu entfernen, mit Piranha-Lösung ($\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ 7:3, 10min) gereinigt und anschließend mit bidestilliertem Wasser bis zum Neutralpunkt gründlich gespült

(ca. 10-mal). Die gereinigten Glasgeräte wurden im Vakuumtrockenschrank bei 10 mbar, 50°C, 24h getrocknet und anschließend mit Aluminiumfolie verschlossen aufbewahrt.

4.3.1.2 Substratreinigung

Es ist äußerst wichtig, die richtige Vorbehandlung der Substrate zu wählen, um sämtliche Kontaminationen, vor allem durch organisch gebundenen Kohlenstoff auszuschließen und somit reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen. Im Verlauf dieser Arbeit wurden zunächst unterschiedliche Reinigungsverfahren getestet, wobei sich eine Kombination aus nasschemischer Reinigung im Ultraschall und einer UV/Ozon-Behandlung als effektivste Methode herausgestellt hat.

1. Titandioxid-/Aluminiumoxidsubstrate zur SPR-spektroskopischen Untersuchung

Die für die SPR-Spektroskopie verwendeten speziellen hochbrechenden LaSFN9-Gläser wurden vor der Bedampfung 10min in Ethanol im Ultraschallbad gereinigt. Nach dem Beschichtungsprozess (Kapitel 4.1.2) wurden durch kurzes Spülen mit Ethanol und Trocknung im N₂-Strom grobe Verunreinigungen (Partikel) entfernt. Anschließend konnte die Oberflächen durch eine UV/Ozon-Behandlung (10min) von organischen Kontaminationen befreit und für den Adsorptionsprozess aktiviert werden.

2. Titandioxidsubstrate

Für Adsorptionsuntersuchen und Proteintest wurden im Rahmen dieser Arbeit hauptsächlich mit 22 nm TiO₂ beschichtete Si-Wafer, der Größe 10 x 10 mm und 12 x 15 mm genutzt [siehe Kapitel 4.1.2]. Die Substratoberflächen wurden mittels ex-situ-Ellipsometrie, in-situ-Ellipsometrie, XPS, winkelabhängige XPS, Kontaktwinkelmessung und Mikrotropfenanalyse untersucht und charakterisiert. In der nachfolgenden Tabelle ist die optimierte Reinigungsprozedur beschrieben.

Tabelle 4-5: Reinigungsprotokoll für TiO₂-Substrate

Reinigungsschritt	Reinigungsmethode
1.	Ultraschallbad: 2 x 7 min Toluol; 2 x 7 min <i>iso</i> -Propanol
2.	Trocknen im N ₂ -Strom
3.	UV/Ozon Behandlung (30 min)

Zur UV/Ozon Behandlung wurde das Gerät der FA. BOEKEL INDUSTRIES, INC., UV-CLEAN, MODEL 135500.

3. Strukturierte Oberflächen

Die Reinigung der strukturierten Substrate erfolgte nach unten stehender Methode:

Tabelle 4-6: Reinigungsprotokoll für strukturierte Substrate

Reinigungsschritt	Reinigungsmethode
1.	Ultraschallbad: 15 min N-Methyl-2-pyrrolidon; 15 min Aceton 7 min <i>iso</i> -Propanol
2.	Spülen mit <i>iso</i> -Propanol, bidestilliertem Wasser
3.	Trocknen im N ₂ -Strom
4.	UV/Ozon Behandlung (30 min)

Nach der allgemeinen Reinigung und Aktivierung der Substrate wurden diese entweder sofort in die Adsorptionslösung zur Oberflächenmodifizierung gegeben oder die reinen Oberflächen zeitnah charakterisiert.

4.3.2 Protokoll zur Adsorption von Monoalkylphosphorsäure- und Alkylphosphonsäurederivaten

Die Präparation von SA-Monoschichten erfolgte nach den in Tabelle 4-7 aufgeführten Schritten. Der Adsorptionsprozess umfasst die Herstellung der Adsorptionslösung, die Reinigung und Aktivierung der Substratoberfläche und den SA-Prozess.

Tabelle 4-7: Protokoll zur Adsorption von Monoalkylphosphorsäure- und Alkylphosphonsäurederivaten auf TiO₂/SiO₂ Substraten

Schritt	Prozess	Konzentration der Lösung	Vermerk
A1.	Herstellung der Adsorptionslösung	10 ⁻³ mol/l	Details siehe Tabelle 4-2; Lösung sollte möglichst frisch hergestellt werden, Lagerung bei 7°C
A2.	Reinigung der Substrate	-	Details siehe Tabellen 4-5, 4-6; Reinigungsprozess unmittelbar vor Adsorption
A3.	Einbringen des Substrates in das Adsorptionsgefäß (Pillengläschen)	-	Proben sind vertikal im Adsorptionsgefäß zu platzieren, um Ablagerungen auf der Oberfläche (wie Partikel) zu vermeiden; Proben werden vor dem Einfüllen der Adsorptionslösung platziert, um Bildung von Langmuir-Blodgett-Film zu vermeiden
A4.	Einfüllen der Adsorptionslösung (filtriert)	10 ⁻³ mol/l	Adsorptionslösung wird durch einen Spritzenfilter (Porengröße 0,2 µm) gegeben, um ungelöste Substanz und Partikel zu entfernen
A5.	Adsorption (Self-Assembly-Prozess)	10 ⁻³ mol/l	für eine Adsorptionszeit zwischen 1h und 48h werden die Gefäße dunkel, bei Raumtemperatur aufbewahrt
A6.	Spülen	-	Proben werden gründlich mit reinem Lösungsmittel gespült
A7.	Trocknung der Proben	-	Proben werden im N ₂ -Strom getrocknet, in Zellkulturplatten dunkel gelagert, Substrate sollten möglichst zeitnah charakterisiert werden

4.3.3 Protokoll zur Durchführung von Proteinadsorptionstests

Nach der erfolgreichen Adsorption der Monoalkylphosphorsäure- und Alkylphosphonsäurederivate konnten spezifische und unspezifische Proteinadsorptionen (siehe Kapitel 4.2.4) untersucht werden. Zuvor war es allerdings notwendig, die Stabilität der Monoschichten gegenüber Pufferlösungen zu testen, da alle Proteinversuche in Puffersystemen (siehe Kapitel

4.2.3) durchgeführt wurden. Das Protokoll für Stabilitätstests und unspezifische Proteinadsorptionsstudien sind in Tabelle 4-8 aufgeführt.

Tabelle 4-8: Protokoll zu Stabilitätstests und unspezifische Proteinadsorptionsstudien

Schritt	Prozess	Konzentration der Lösung	Vermerk
A1.-7.	Herstellung der beschichteten Substrate	10^{-3} mol/l Adsorptionslösung	Details siehe Tabelle 4-7
P1.	Stabilitätstest und Equilibrierung in Pufferlösung (Auslagerung der beschichteten Substrate)	Pufferlösungen (PBS, HEPES2 oder Tris)	Details zu Puffersystemen siehe Tabelle 4-3, Substrate wurden horizontal in Zellkulturplatten platziert und mit 1 ml Pufferlösung überschichtet, Auslagerungszeit 2h, Aufbewahrung im Dunkeln
P2a.	Stabilitätstest (Überprüfung der Schichtdicke)	-	nach 2h Entnahme der Substrate aus der Pufferlösung; gründlich mit Wasser spülen, Trocknung im N_2 -Strom; Charakterisierung
P2b.	Proteintest (Einbringen der Substrate in Proteinlösung)	100 μ g Protein / 100 ml Pufferlösung, (BSA; Fibrinogen; HSA; Lysozym; Hämoglobin, FHS)	Substrate werden direkt von der Pufferlösung in die Proteinlösung eingebracht; Auslagerungszeit 20min
P3.	Spülen der Substrate	1. Pufferlösung, 2. Wasser	nach 20min Entnahme der Substrate aus der Proteinlösung, direkte Einbringung in die Pufferlösung für 20min; Proben werden anschließend sehr gründlich mit Wasser gespült
P4.	Trocknung	-	Proben werden im N_2 -Strom getrocknet, dunkle Lagerung in Zellkulturplatten, zeitnahe Charakterisierung

Die unspezifischen Anbindungsversuche wurden mit den Proteinen: BSA, Fibrinogen, FHS, Hämoglobin und Lysozym durchgeführt. Für eine spezifische Adsorption wurden für das Carboxylderivat ($COOH-EG_3-C_{17}-PO_3H_2$) Poly-L-Lysin und für das Aminoderivat ($NH_2-EG_3-C_{17}-PO_3H_2$) Biotin und nachfolgend Streptavidin gewählt.

Anlagerung von Poly-L-Lysin

Tabelle 4-9: Protokoll zur spezifischen Anbindung von Poly-L-Lysin

Schritt	Prozess	Konzentration der Lösung	Vermerk
A1.-7.	Herstellung der mit COOH-EG₃-C₁₇-PO₃H₂ beschichteten Substrate	10 ⁻³ mol/l Adsorptionslösung	Details siehe Tabelle 4-7
S1.	Aktivierung der Carboxylspezies als Oberflächenreaktion	0,4 mol/l EDC-; 0,1 mol/l NHS-Lösung	Details siehe Syntheseteil Kapitel 3.8.1; Durchführung in Pillengläschen oder Flüssigkeitsmesszelle der SPR-Spektroskopie
S2.a	Spülen der Probe		sehr gründliches Spülen der Probe mit Wasser
S2.b	Trocknung		Trocknung im N ₂ -Strom (nicht bei SPR)
S3.	Stabilitätstest und Equilibrierung in Pufferlösung (Auslagerung der beschichteten Substrate)	Pufferlösungen (HEPES2)	Details zum Puffersystem siehe Tabelle 4-3, Substrate wurden horizontal in Zellkulturplatten platziert und mit 1 ml Pufferlösung überschichtet; Auslagerungszeit 2h, Aufbewahrung im Dunkeln
S4.	Proteintest (Einbringen der Substrate in Proteinlösung)	100 µg Protein / 100 ml Pufferlösung, (Poly-L-Lysin)	Substrate werden direkt von der Pufferlösung in die Proteinlösung eingebracht; Auslagerungszeit 2h
S5.	Spülen der Substrate	1. Pufferlösung, 2. Wasser	nach 2h Entnahme der Substrate aus der Proteinlösung, direkte Einbringung in die Pufferlösung für 20min; Proben werden anschließend sehr gründlich mit Wasser gespült
S6.	Trocknung	-	Proben werden im N ₂ -Strom getrocknet, dunkle Lagerung in Zellkulturplatten, zeitnahe Charakterisierung

Anlagerung von Streptavidin

Tabelle 4-10: Protokoll zur spezifischen Anbindung von Streptavidin

Schritt	Prozess	Konzentration der Lösung	Vermerk
A1.-7.	Herstellung der mit NH₂-EG₃-C₁₇-PO₃H₂ beschichteten Substrate	10 ⁻³ mol/l Adsorptionslösung	Details siehe Tabelle 4-7
S1.	Anbindung von Biotin an die Amino-Spezies als Oberflächenreaktion	0,1 mol/l Biotin; 0,1 mol/l NHS; 0,1 mol/l DCC	Details siehe Kapitel 3.8.2; Durchführung in Pillengläschen oder Flüssigkeitsmesszelle der SPR-Spektroskopie
S2.a	Spülen der Probe		sehr gründliches Spülen der Probe mit DMF und anschließend Wasser
S2.b	Trocknung		Trocknung im N ₂ -Strom (Umbau der SPR-Apparatur)
S3.	Stabilitätstest und Equilibrierung in Pufferlösung (Auslagerung der beschichteten Substrate)	Pufferlösungen (HEPES2)	Details zum Puffersystem siehe Tabelle 4-3, Substrate wurden horizontal in Zellkulturplatten platziert und mit 1 ml Pufferlösung überschichtet; Auslagerungszeit 2h, Aufbewahrung im Dunkeln
S4.	Proteintest (Einbringen der Substrate in Proteinlösung)	100 µg Protein / 100 ml Pufferlösung, (Streptavidin)	Substrate werden direkt von der Pufferlösung in die Proteinlösung eingebracht; Auslagerungszeit 2h
S5.	Spülen der Substrate	1. Pufferlösung, 2. Wasser	nach 2h Entnahme der Substrate aus der Proteinlösung, direkte Einbringung in die Pufferlösung für 20min; Proben werden anschließend sehr gründlich mit Wasser gespült
S6.	Trocknung	-	Proben werden im N ₂ -Strom getrocknet, dunkle Lagerung in Zellkulturplatten, zeitnahe Charakterisierung

4.4 Protokolle zur Oberflächencharakterisierung

In diesem Kapitel werden Methoden zur qualitativen und quantitativen Untersuchung von Oberflächen beschrieben. Die Wahl der Methode zur Charakterisierung von Oberflächeneigenschaften richtet sich sehr stark nach den spezifischen Fragestellungen. So kann zum Beispiel bei glatten Materialien die Oberfläche als äußerste Schicht, bei porösen Materialien als Basisschicht mit einer Tiefe von wenigen Nanometern definiert werden.

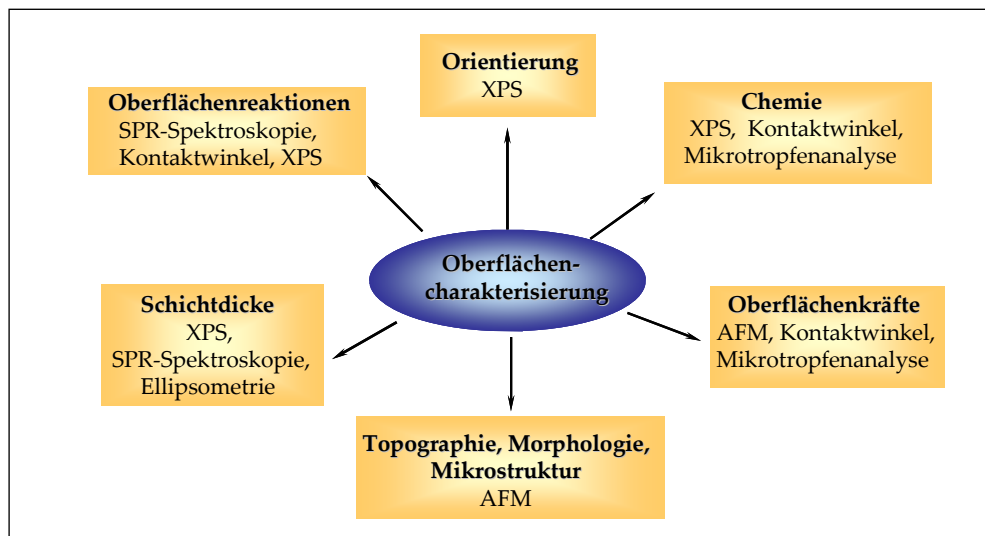


Abbildung 4-10: Übersicht der Techniken zur Bestimmung chemischer Zusammensetzung, Struktur, Orientierung und weiterer physikalisch-chemischer Eigenschaften von Oberflächen, Grenzflächen und dünnen Schichten [18]

Abbildung 4-10 zeigt eine Übersicht der zu prüfenden Eigenschaften und der in Frage kommenden Analysemethoden.

Im Verlauf dieser Arbeit wurden die unter Abbildung 4-10 aufgeführten Techniken zur Charakterisierung der Substratoberflächen vor, während (in-situ) und nach der Abscheidung von dünnen Schichten herangezogen.

4.4.1 Kontaktwinkelmessungen

4.4.1.1 Methode und Messprinzip

Die Kontaktwinkelmessung ist eine oberflächensensitive Charakterisierungsmethode, mit deren Hilfe das Benetzungsverhalten von Festkörpern beurteilt werden kann. Es handelt sich dabei um die einfache, aber sehr empfindliche Charakterisierung von planaren Oberflächen.

Bei der Kontaktwinkelmessung wird ein Flüssigkeitstropfen (meist Wasser) auf die zu untersuchende Festkörperoberfläche, die von einem Gas (Luft) umgeben ist, aufgebracht. Dieser Tropfen breitet sich nun so lange aus (Spreiten), bis ein Gleichgewichtszustand erreicht ist [122]. Der Eigenschaft eines Tropfens einer nicht spreitenden Flüssigkeit auf einer Festkörperoberfläche liegt die Gleichung nach YOUNG zu Grunde:

Gleichung 4-1: YOUNG'SCHE Gleichung

$$\sigma_s = \sigma_l \cos \theta + \gamma_{sl}$$

σ_l : Oberflächenspannung der Flüssigkeit; σ_s : Freie Oberflächenenergie des Festkörpers; γ_{sl} : Grenzflächenenergie zwischen Flüssigkeit und Festkörper; θ : Kontaktwinkel

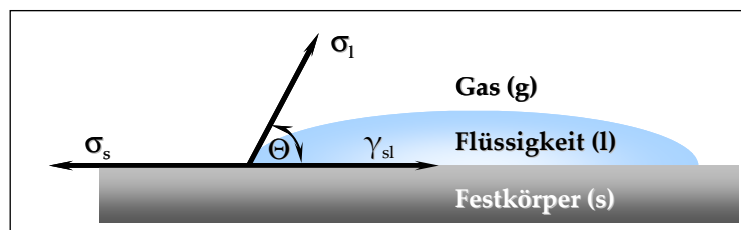


Abbildung 4-11: Wirkende Spannungen beim liegenden Tropfen [124]

Hierbei ist θ der Winkel, der als Kontakt- oder Randwinkel bezeichnet wird. Ist der Kontaktwinkel kleiner als 90° , kann man von einer Benetzung, d.h. der Ausbildung einer Grenzfläche zwischen Flüssigkeit und Festkörper, der Festkörperoberfläche durch die Flüssigkeit sprechen. Bildet sich auf Grund der Spreitung des Tropfens kein Kontaktwinkel aus, so handelt es sich um eine vollständige Benetzung der Festkörperoberfläche. Ist der Kontaktwinkel größer als 90° , handelt es sich um einen Festkörper, der durch die Flüssigkeit nicht benetzbar ist [124].

Die YOUNG'SCHE GLEICHUNG gilt aber nur für ideale Oberflächen im thermodynamischen Gleichgewicht. Real beeinflussen auch Größen wie Rauigkeit, Orientierungsprozesse von Molekülen an der Oberfläche, Löslichkeit von Oberflächenkomponenten, chemische Heterogenitäten und Adsorptionsvorgänge den Kontaktwinkel. Um diese Einflussgrößen so minimal wie möglich zu halten, wurden verschiedene Techniken, denen unterschiedliche Auswertemethoden zu Grunde liegen, entwickelt.

Zur Bestimmung des Randwinkels von Flüssigkeiten auf Festkörperoberflächen, wurde die Methode des liegenden Tropfens verwendet, mit dem eine statische als auch dynamische

Kontaktwinkelmessung möglich war. Dazu erfolgte die Beschichtung von Titandioxidsubstratoberflächen mit Monoalkylphosphorsäure- und Alkylphosphonsäurederivaten. Die genannten Methoden wurden angewandt, um Aussagen über die makroskopische Oberflächenbeschaffenheit zu erhalten.

Die Methoden der Kontaktwinkelbestimmung werden im Folgenden beschrieben.

Methoden des liegenden Tropfens [124]

Bei der statischen Kontaktwinkelbestimmung wird mit Hilfe einer Mikroliterspritze ein bestimmtes, durch das Messgerät gesteuertes Flüssigkeitsvolumen in Form eines Tropfens auf eine horizontal, ebene Festkörperoberfläche aufgebracht. Der Tropfen kann nun mittels Mikroskop oder Digitalkamera und der entsprechenden Bildauswertesoftware auf dem PC sichtbar gemacht und die Tropfengeometrie erfasst werden. Dazu stehen wiederum unterschiedliche Methoden zur Verfügung, die den jeweils auftretenden Problemen gerecht werden. Es wurden hauptsächlich die TANGENTEN-Methode und die YOUNG-LAPLACE-Methode zur Auswertung herangezogen.

a) TANGENTEN-Methode

Bei dieser Methode wird die Kontur des Tropfens als Kurve errechnet und die Tangente an den Berührungspunkten des Tropfens mit der zu untersuchenden Oberfläche ermittelt. Der Winkel der Tangente mit der Oberfläche entspricht in diesem Fall dem Kontaktwinkel.

b) YOUNG-LAPLACE-Methode

Das bestimmte Tropfenprofil wird hier dem theoretischen Tropfenprofil nach LAPLACE gegenübergestellt und letztlich diesem angepasst. Die beste Anpassung liefert den Kontaktwinkel.

Das Prinzip der dynamischen Kontaktwinkelmessung besteht darin, dass ein Flüssigkeitstropfen auf eine ebene horizontale Substratoberfläche aufgebracht und durch Belassen der Kanüle im Tropfen, dieser weiter vergrößert und anschließend wieder aufgesaugt wird. Die jeweilige Geometrie des fortschreitenden und rückschreitenden Tropfens wird wie auch schon bei der statischen Kontaktwinkelbestimmung beschrieben, mittels Digitalkamera erfasst und der Kontaktwinkel nach der TANGENTEN-Methode bzw. der YOUNG-LAPLACE-Methode berechnet.

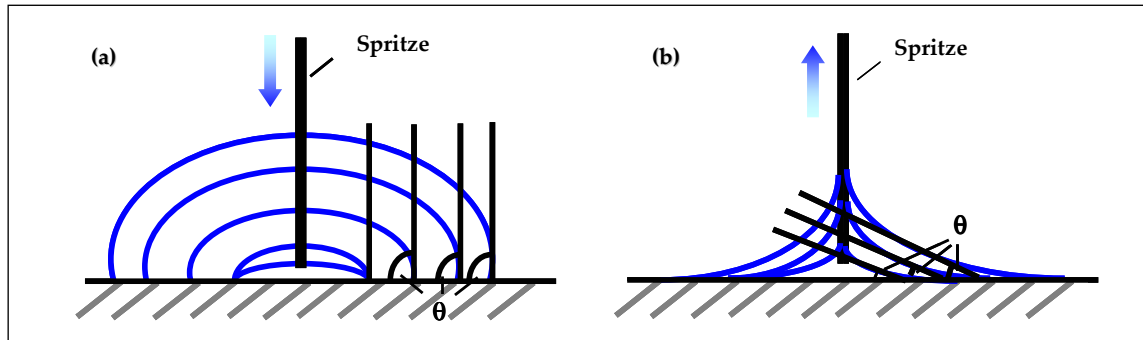


Abbildung 4-12: Erzeugung des a) Fortschritt- und b) Rückzugswinkels

Im Allgemeinen sind fortschreitender und rückschreitender Winkel auf realen Oberflächen unterschiedlich. Die Differenz zwischen diesen Winkeln wird als Kontaktwinkelhysterese bezeichnet und stellt somit ein Maß für die chemische Heterogenität und die Oberflächenrauigkeit dar. Je größer der Hysteresewert ist, desto größer ist die Oberflächenrauigkeit. Es besteht somit ein direkter Zusammenhang zwischen den Hysteresewerten und den genannten Oberflächeneigenschaften.

Oberflächenenergie

Der absolute Wert der Oberflächenenergie (exakter: freien Energie der Oberfläche) eines kristallinen Feststoffs ist eine der wichtigsten fundamentalen Größen, die eine Vielzahl von Grundlagen und Phänomenen charakterisieren. Zu diesen gehören zum Beispiel das kristalline Wachstum oder das Wachstum von dünnen Schichten. Die Oberflächenenergie entspricht der Energie, die nötig ist, um chemische Bindungen aufzubrechen, damit neue Oberflächen eines Festkörpers erzeugt werden. Sie ist definiert als die Energie, die zum Erzeugen der Oberfläche je Flächeneinheit aufgewendet werden muss. Die Oberflächenenergie ist immer positiv, weil Energie benötigt wird, um Bindungen aufzubrechen. Da der thermodynamisch stabile Zustand eines Systems derjenige mit der geringsten (freien) Energie ist, hat jedes System das Bestreben, Oberflächen mit hoher Oberflächenenergie zu vermeiden oder zu minimieren. Das heißt: Oberflächen mit höherer Energie (Materialien mit starken Bindungen, hoher Schmelzpunkt) werden leicht durch Materialien mit geringerer Oberflächenenergie bedeckt [123].

Die Oberflächenenergie von planaren glatten Substratoberflächen kann indirekt über die statische Kontaktwinkelmessung von mindestens zwei verschiedenen Flüssigkeiten mit bekannter Oberflächenspannung bestimmt werden. Zur Berechnung der Energie können die

folgenden Methoden genutzt werden: das Verfahren nach ZISMAN, das Verfahren von OWENS, WENDT, RABEL und KAEUBLE sowie das Verfahren nach SCHULTZ [124].

Nach OWENS, WENDT, RABEL und KAEUBLE lässt sich die Oberflächenspannung jeder Phase in einen polaren und einen dispersiven Anteil aufspalten [124]:

Gleichung 4-2:

$$\begin{aligned}\sigma_l &= \sigma_l^p + \sigma_l^D \\ \sigma_s &= \sigma_s^p + \sigma_s^D\end{aligned}$$

σ_l : Oberflächenspannung flüssig/fest; σ_l^D : disperser Anteil der Oberflächenspannung flüssig/fest; σ_l^p : polarer Anteil der Oberflächenspannung flüssig/fest; σ_s^D : disperser Anteil der Oberflächenspannung fest/gasförmig; σ_s^p : polarer Anteil der Oberflächenspannung fest/gasförmig

Dispersive Wechselwirkungen bestehen zwischen allen Atomen und Molekülen, polare Kräfte dagegen nur in bestimmten Molekülen. Die polaren Wechselwirkungen haben ihre Ursache in der unterschiedlichen Elektronegativität verschiedener Atome eines Moleküls. OWENS, WENDT, RABEL und KAEUBLE (1969) leiteten aus der Polarität von Flüssigkeiten einen polaren Anteil der Oberflächenspannung ab, der zusammen mit dem dispersiven Anteil die Gesamtoberflächenspannung ergibt [124]:

Gleichung 4-3:

$$\sigma = \sigma^p + \sigma^D$$

σ : Gesamtoberflächenspannung; σ^D : disperser Anteil der Oberflächenspannung; σ^p : polarer Anteil der Oberflächenspannung

Die Berechnung der Oberflächenenergie des Festkörpers bei der Methode nach OWENS, WENDT, RABEL und KAEUBLE erfolgt in einem Schritt. Sie legten ihrer Gleichung die Grenzflächenspannung γ zugrunde

Gleichung 4-4:

$$\gamma_{sl} = \sigma_s + \sigma_l - 2 (\sqrt{\sigma_s^D \cdot \sigma_l^D} + \sqrt{\sigma_s^p \cdot \sigma_l^p})$$

und kombinierten sie mit der YOUNG'SCHEN-Gleichung (Gleichung 4-1).

OWENS und WENDT lösten das Gleichungssystem mit Hilfe von Kontaktwinkeln zweier Flüssigkeiten mit bekanntem dispersiven und polaren Anteil der Oberflächenspannung. KAEUBLE gelangte zum Ergebnis, indem er mehrere Kombinationen aus jeweils zwei Flüssigkeiten bildete und den Mittelwert der resultierenden Oberflächenenergiewerte

berechnete. RABEL ermöglichte die Berechnung des polaren und dispersiven Anteils der Oberflächenenergie mit Hilfe einer einzigen linearen Regression aus Kontaktwinkeldaten verschiedener Flüssigkeiten. Er kombinierte die Gleichungen 4-1 und 4-4 und passte die resultierende Gleichung durch Umstellung an die allgemeine Geradengleichung $y = mx + b$ an. Die angepasste Gleichung hat die Form [124]:

Gleichung 4-5:

$$\underbrace{\frac{(1 + \cos\theta) \cdot \sigma_l}{2 \sqrt{\sigma_l^D}}}_{y} = \underbrace{\sqrt{\sigma_s^P}}_m \underbrace{\sqrt{\frac{\sigma_l^P}{\sigma_l^D}}}_x + \underbrace{\sqrt{\sigma_s^D}}_b$$

θ : Kontaktwinkel

Bei einer linearen Regression der Auftragung von y gegen x ergibt sich σ_s^P aus dem Quadrat der Geradensteigung m und σ_s^D aus dem Quadrat des Ordinatenabschnitts b .

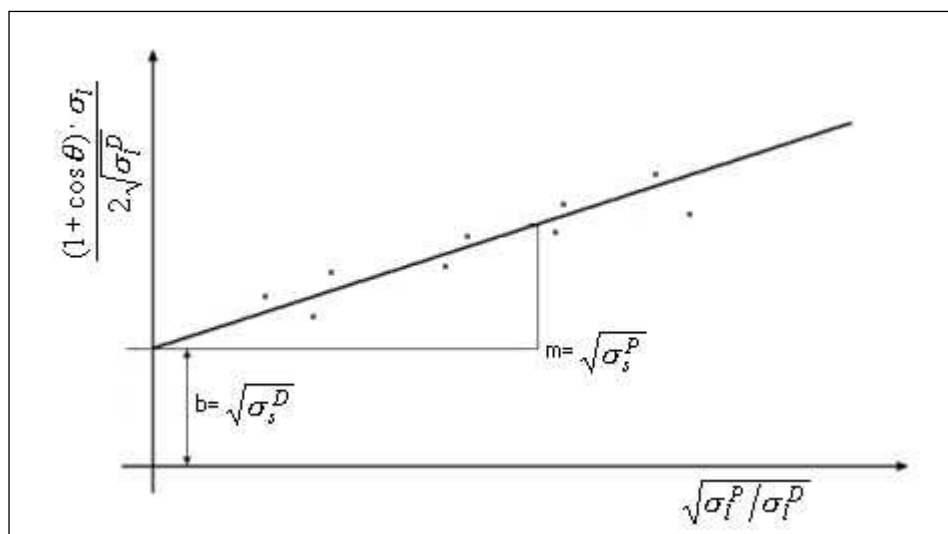


Abbildung 4-13: Bestimmung des dispersiven und polaren Anteils der Festkörperoberflächen-spannung nach RABEL [124]

4.4.1.2 Anwendung auf Monoschichten

Die Benetzbarkeit von beschichteten Metalloberflächen ist hinsichtlich Proteinresistenz und Zellanbindung ein sehr wichtiges Kriterium. Diese Eigenschaft wird in der Literatur sehr oft über die statische als auch dynamische Kontaktwinkelmessung bestimmt [49, 50, 125, 126, 127].

4.4.1.3 Protokoll zur Kontaktwinkelmessung

Die unter Kapitel 5.3.1.2 angegebenen dynamischen und statischen Kontaktwinkelwerte sowie die Oberflächenenergien der modifizierten metalloxidischen Oberflächen wurden an dem Kontaktwinkelmessgerät DSA 10 der Fa. KRÜSS INSTRUMENTS gemessen. Dazu wurde die Methode des liegenden Tropfens angewandt. Die Auswertung erfolgte mit der entsprechenden KRÜSS Software Drop Shape Analysis 1.51. Das Flüssigkeitsvolumen des auf das zu untersuchenden Substrat aufgebrachten Tropfens umfasste 4 µl. Die resultierende Tropfengröße ermöglichte es mehrere Messungen an unterschiedlichen Stellen auf einem Substrat durchzuführen und somit gemittelte Daten zu erhalten. Es wurden jeweils vier Substrate vermessen und daraus der Mittelwert gebildet. Zur Bestimmung der dynamischen und statischen Kontaktwinkel wurden bidestilliertes Wasser und zur Bestimmung der Oberflächenenergie nach OWENS, WENDT, RABEL und KAEUBLE bidestilliertes Wasser, Diiodmethan und Glycerol als Testflüssigkeiten verwendet. Die zur Untersuchung vorgesehenen TiO₂-Substrate wurden nach Schritt A1-A7 (Tabelle 4-7, Kapitel 4.3.2) vorbereitet und zeitnah vermessen.

4.4.2 Mikrotropfenanalyse

4.4.2.1 Methode und Messprinzip

Die Abkühlung einer Oberfläche unter den Taupunkt führt zu einer Kondensation von Luftfeuchte aus der Atmosphäre. Diese schlägt sich als Wasser, zunächst in Form von Tröpfchen und später als homogener Film auf einer Oberfläche nieder. Die Ausbildung von mikroskopisch kleinen Tropfen beginnt meistens an Stellen erhöhter Oberflächenenergie, welche Kondensationskeime darstellen. Im weiteren Verlauf der Kondensation wachsen die

Tropfchen bis sie schließlich zusammen fließen und einen homogenen Film ausbilden. Die Analyse beschränkt sich auf die Erfassung der Geschwindigkeit der Tropfenbildung, des Tropfenwachstums und der Koaleszenz. Dabei spielt, unter der Voraussetzung, dass die Oberflächenbedeckung mit Tropfen klein ist und die Tropfen klein genug sind, die Brown'sche Molekularbewegung eine große Rolle. Sie bewirkt, dass kleinste Tropfen, welche sich schnell über die Oberfläche bewegen können, an Stellen hoher Oberflächenenergie liegen bleiben. Durch die Struktur, die eine kondensierte Flüssigkeit auf einer Oberfläche ausbildet, können Rückschlüsse auf Regionen mit unterschiedlicher Benetzbarkeit gezogen werden. Diese Unterschiede können auf Kontaminationen auf der Oberfläche zurückzuführen sein sowie auf physicochemische Unterschiede in der Oberflächenbeschaffenheit. Interessant ist dieser Sachverhalt in Hinsicht auf Oberflächen, die durch Adsorption von bestimmten Substanzen modifiziert wurden [128].

G. Busch entwickelte im Rahmen seiner Dissertation [129] eine Mikrotropfenanalyse-Apparatur, die aus den folgenden Bauteilen (Abbildung 4-14) besteht:

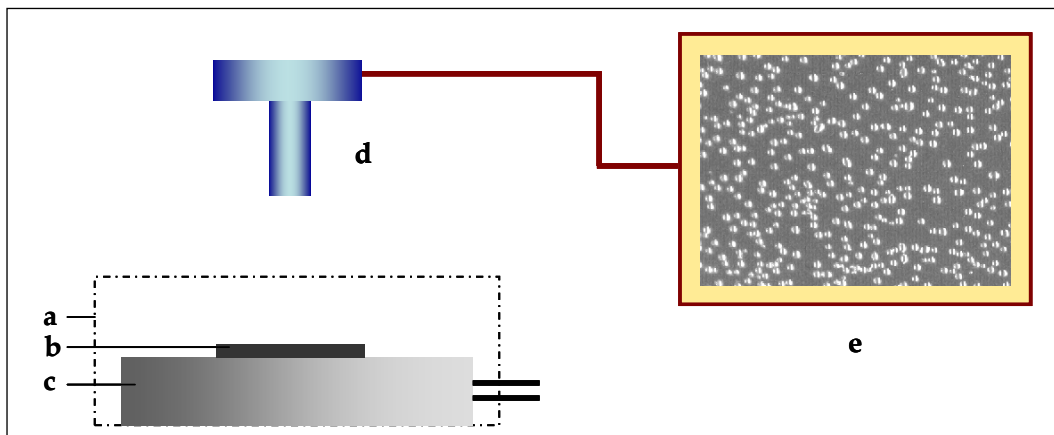


Abbildung 4-14: Stark vereinfachte schematische Darstellung der Mikrotropfenanalyse-Apparatur. Die zu analysierende Probe (b) ist auf einem temperierbaren Tisch (c) aufgebracht innerhalb einer transparenten Box (a) [128]. Mit Hilfe eines PELTIER-Elementes kann die Temperatur elektronisch gesteuert und die Probe somit unter den Taupunkt abgekühlt werden. Das Wachstum der Tröpfchen kann über ein CCD-Kamera-System beobachtet werden [129, 130].

4.4.2.2. Protokoll zur Mikrotropfenanalyse

Durch die Absenkung der Temperatur mit Hilfe eines elektronisch steuerbaren PELTIER-Elementes konnte die Kondensation einer Flüssigkeit (Wasser) aus der Gasphase bewirkt werden. Das Wachstum der Tröpfchen auf der Probenoberfläche, speziell die Kontur der

Tropfen wurde in Abhängigkeit von der Zeit mit Hilfe einer Kombination aus Mikroskop (Olympus BX 40) mit 100facher Vergrößerung und einer CCD-Kamera (JVC TK-C1380E) erfasst. Diese Bilder konnten mit einem von *G. Busch* [129] entwickelten und *T. Junghans* [130] optimierten Software-Programm analysiert werden. Die Auswertung der erhaltenen Kondensationsbilder (Anzahl der Tropfen pro mm² oder Mikrotropfendichte (μDD) [131]) ermöglichte Aussagen über die makroskopische Heterogenität anhand der Verteilung der Tropfen auf der Probenoberfläche.

Die Mikrotropfenanalyse-Untersuchungen wurde von den in Tabelle 4-2 aufgeführten, auf TiO₂ adsorbierten Verbindungen (Details siehe Tabelle 4-7) im Rahmen der Diplomarbeit von *T. Junghans* [130] durchgeführt.

4.4.3 Atom-Kraft-Mikroskopie

4.4.3.1 Methode und Messprinzip

Die Atom-Kraft-Mikroskopie (engl.: Atomic Force Microscopy) (AFM) ist eine hochauflösende Mikroskopie- und Spektroskopietechnik, welche zurzeit am häufigsten zur optischen Oberflächencharakterisierung verwendet wird [129]. Diese Methode ermöglicht die Untersuchung der Oberflächentopographie von beliebigen Materialien, wie zum Beispiel von Festkörperoberflächen, biologischen und medizinischen Materialien. Bei der AFM wird eine sehr feine Spitze (Tip) an einem Federbalken (Cantilever) tastend über eine Oberfläche bewegt. Der Cantilever wird durch einen Piezomanipulator geführt, der eine Bewegung im Nanometerbereich zulässt. Die Wechselwirkung der Spitze mit der Oberfläche ist das Resultat der Wirkung einer Reihe von Kräften, wie zum Beispiel elektrostatische und Van-der-Waals-Wechselwirkungen. Die Auslenkung der Spitze kann direkt durch eine Photozelle, die einen reflektierten Laserstrahl detektiert, der vom Cantilever ausgeht, beobachtet werden. Das AFM kann in zwei Betriebsmodi; dem „Kontakt Modus“ oder dem „Tappingmodus“ arbeiten. Beim „Kontaktmodus“ wird die Spitze mit einer definierten Auflagekraft über die Probenoberfläche geführt. Dabei wird der Druck auf die Oberfläche konstant gehalten, während die Spitze durch Auf- und Abbewegungen das Oberflächenprofil abastert. Über die dafür erforderliche Auslenkung wird das Oberflächenprofil erstellt. Im „Tappingmodus“ wird die Spitze zur Eigenschwingung angeregt und der Probenoberfläche angenähert. Dabei wird die Auslenkung

wie beim „Kontaktmodus“ elektronisch geregelt. Es tritt eine Wechselwirkung zwischen Oberfläche und Spitze auf, die zu einer Verschiebung der Phase zwischen Anregungsfrequenz und der Frequenz der Spitze führt. Liegt eine weiche Oberfläche vor, bilden sich durch ein tiefes Eindringen der Spitze in die Oberfläche starke Wechselwirkungen aus. Im Gegensatz dazu stehen harte Oberflächen. Im Kraft-Weg Diagramm können diese Wechselwirkungen verfolgt und analysiert werden.

Mit Hilfe von AFM-Untersuchungen können die Oberflächenrauigkeitsparameter, der Roughness-Average Wert (R_a) sowie der Root Mean Square Wert (RMS, R_q) ermittelt werden, die wie folgt definiert sind.

Der Roughness-Average-Wert (R_a)

Der Wert für die mittlere Rauigkeit einer Oberfläche (R_a) wird über die Fläche des gemessenen Flächenprofils und der Mittelwertlinie des Profils bestimmt. Das AFM rastert den zu untersuchenden Bereich in bestimmten Schritten ab. Aus der Anzahl der Messpunkte N lässt sich dann aus einem digitalen Höhenprofil der R_a -Wert wie folgt berechnen:

Gleichung 4-6: Ermittlung des R_a -Wertes

$$R_a = \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N |r_n|$$

N : Anzahl der ermittelten Messpunkte; r_n : Differenz des n -ten Wertes zum Mittelwert aller Messpunkte

Der Root-Mean-Square-Wert (RMS, R_q)

Liegt ein digitales Oberflächenprofil vor, kann R_q wie folgt bestimmt werden:

Gleichung 4-7: Ermittlung des R_q -Wertes

$$R_q = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{n=1}^N r_n^2}$$

N : Anzahl der ermittelten Messpunkte; r_n : Differenz des n -ten Wertes zum Mittelwert aller Messpunkte

4.4.3.2. Protokoll zur AFM-Messung

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten AFM-Messungen zur Bestimmung der Oberflächenrauigkeit von TiO₂- und Au/Al₂O₃-Substraten erfolgten am Institut für Halbleiter- und Mikrosystemtechnik der TU Dresden. Dazu wurden die Substrate wie unter Kapitel 4.3.1.2 beschrieben vorbehandelt. Die Messungen erfolgten an dem AFM Gerät Dimension 13500, Nanoscope III von VEECO DIGITAL INSTRUMENTS im „Kontakt Modus“ (Spitze: Veeco Nanoprobe Tip, Si-Typ, PPP-NCH-20).

AFM-Messungen, die zur Bestimmung der Oberflächentopographie strukturierter Substrate durchgeführt wurden, fanden im Institut für Anorganische Chemie der TU Dresden statt. Dazu wurde das AFM Dimension 3100 mit Nanoscope IV SPM Controller von VEECO DIGITAL INSTRUMENTS im „Tapping-Modus“ (Spitze: Veeco Nanoprobe Tip, Si-Typ, RTE7) verwendet. Es wurden unbehandelte (gereinigte) als auch modifizierte Oberflächen vermessen (Details siehe Kapitel 4.3.1.2 und Kapitel 4.3.2, Tabelle 4-7).

4.4.4 Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR-Spektroskopie)

4.4.4.1 Methode und Messprinzip

Die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (englisch: Surface-Plasmon-Resonance-Spektroskopie, SPR-Spektroskopie) ist eine oberflächensensitive, optische Methode zur Untersuchung von Schichtbildungen auf Oberflächen. Sie eignet sich sehr gut, um die Eigenschaften dünner Filme zu charakterisieren [132]. Die SPR-Spektroskopie basiert auf folgenden physikalischen Grundlagen:

Das Festkörperplasma eines Metalls besteht aus Ionenrümpfen und Elektronengas. Es ist neutral, besitzt aber viele freie Ladungsträger, die durch eine elektrodynamische Anregung an der Oberfläche des Metalls zu Schwingungen gebracht werden können. Die kollektive Anregung von leitfähigen Elektronen, die in der Nähe einer Leiteroberfläche lokalisiert sind, werden Oberflächenplasmonen genannt. Oberflächenplasmonen sind die Quanten dieser Plasmaschwingung. Sie werden aus den Dichteschwingungen des Elektronengases im Metall und den daran gekoppelten elektrodynamischen Schwingungen im Dielektrikum gebildet. In einem System Metall-Dielektrikum kann Plasmonenresonanz erzeugt werden, wenn die

Eigenschaften der Wellen des einfallenden Laserlichtes und der Oberflächenplasmonen gleicher Natur sind. Die Anregung erfolgt durch p-polarisiertes (transversales) Laserlicht mit einer Wellenlänge von 632,8 nm im Bereich der Totalreflexion an der Grenzfläche Metall/Dielektrikum. Die dabei gebildete evaneszente Welle breitet sich mit einer Phasengeschwindigkeit entlang der Grenzfläche von Metallen, wie Gold und Silber, und einem Dielektrikum aus. Oberflächenplasmonen weisen eine Feldamplitude auf, deren Maximum sich an der Grenzfläche befindet und in das Dielektrikum exponentiell abfällt.

Die SPR-spektroskopischen Untersuchungen basieren auf der Detektion der Änderungen des Brechungsindex einer Schicht, die durch ein evaneszentes Feld eines Laserstrahls untersucht wird. Dieses evaneszente Feld wechselwirkt mit der näheren Umgebung des Metalls. Die Eindringtiefe dieses Lichtes in das dielektrische Medium liegt im Bereich von wenigen Hundert Nanometern, woraus sich die Sensitivität der Methode gegenüber der Änderung von Oberflächeneigenschaften ableitet.

Eine der am weitest verbreiteten Variante der SPR-Spektroskopie basiert auf der experimentellen Konfiguration nach KRETSCHMANN [133] (Abbildung 4-15), die auch in dieser Arbeit angewandt wurde. Bei der KRETSCHMANN-Konfiguration liegt das Prisma (ϵ_0) direkt auf der Metallschicht (ϵ_2) auf und wird durch eine Immersionsflüssigkeit (ϵ_1), deren Brechungsindex dem des Substrates entspricht, direkt miteinander in Kontakt gebracht.

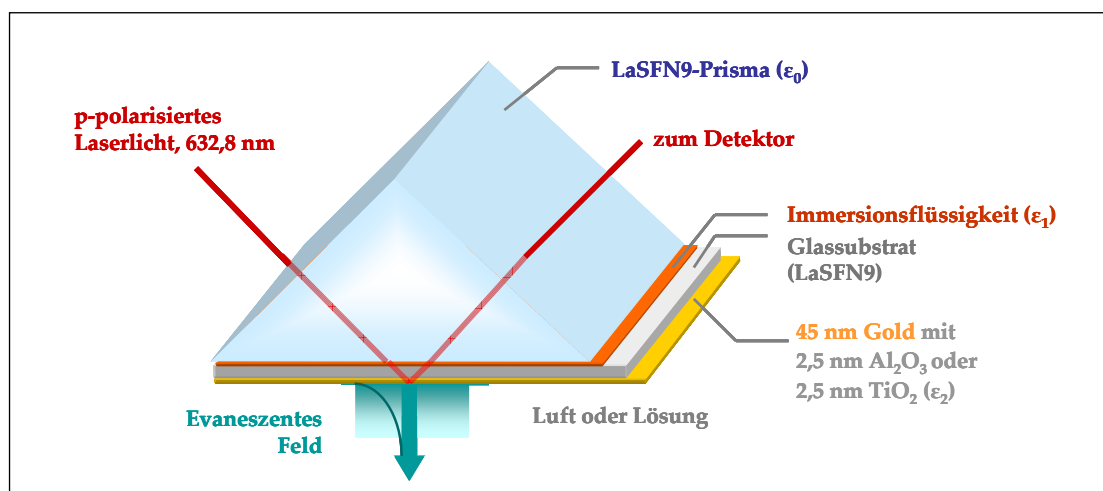


Abbildung 4-15: Schema SPR-Spektroskopie, KRETSCHMANN-Aufbau

Im Experiment wird die Probe einer winkelabhängigen Messung („angular scan“) unterzogen, wobei die Intensität des reflektierten Laserlichtes gegen den Winkel der Probenoberfläche zum

einfallenden Laserstrahl aufgetragen wird. Die Plasmonenresonanz zeigt sich als Minimum in der Kurve. Eine Änderung des Resonanzwinkels wird durch jede optische Veränderung des Dielektrikums herbeigeführt.

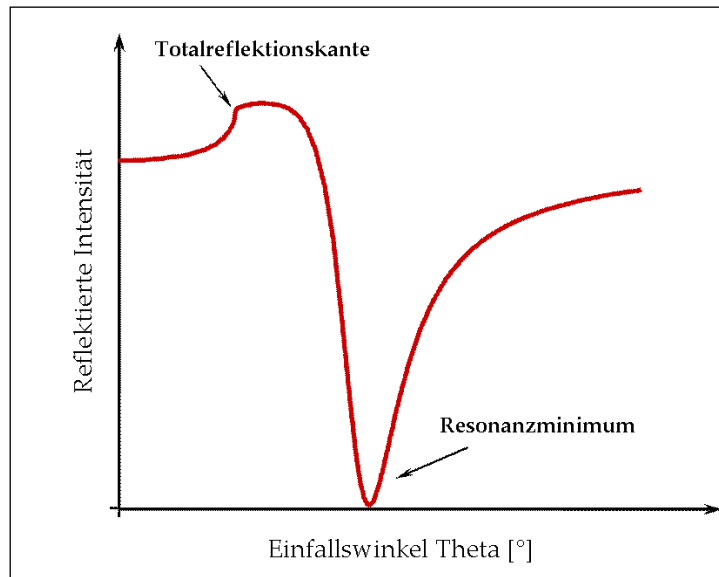


Abbildung 4-16: Winkelabhängiges SPR-Spektrum

Metalle, wie Gold, Silber, Kupfer und Aluminium können für die SPR-Spektroskopie verwendet werden, da sie Leitungsbandelektronen besitzen, die mit Licht im sichtbaren bzw. nahen Infrarotbereich Resonanzen eingehen können. Dabei sollte folgendes beachtet werden: Das Metall sollte mit der zur Anwendung kommenden Chemie kompatibel sein. Bei der Oberfläche, die dem Laserstrahl ausgesetzt wird, sollte es sich um das reine Metall handeln, da zum Beispiel durch atmosphärische Einflüsse gebildete Oxide mit der SPR interferieren können. Gold hat sich als das zweckmäßigste Metall herausgestellt, da es ein starkes und einfach zu messendes SPR-Signal im nahen Infrarotbereich erzeugt. Außerdem ist es äußerst resistent gegenüber Oxidationsprozessen und Kontaminationen, eignet sich aber sehr gut zur Anbindung von SA-Molekülen, wie zum Beispiel von Alkanthiolen [8, 9, 10, 26, 31]. Die anderen Metalle sind aus praktischer Sicht eher ungeeignet. Kupfer und Aluminium liefern ein zu breites SPR-Signal. Silber reagiert zu empfindlich auf Oxidationsprozesse [134].

Werden die Oberflächenplasmonen angeregt, so liegt das Intensitätsmaximum des evaneszenten Feldes genau an der Grenzschicht von Metall und Dielektrikum und dringt dabei bis zu einer ungefähren Tiefe von einer Wellenlänge in das Dielektrikum ein. Daraus lässt sich schließen, dass jede Veränderung im optischen Verhalten des Dielektrikums in seiner Tiefe eine Änderung des Verteilungsverhaltens der Plasmonenwelle in Dielektrikum und Metall und

damit eine Änderung des Resonanzwinkels (Messgröße) hervorrufen wird. Erhöht sich die optische Dicke der Schicht, wird das Signal zu größeren Winkeln verschoben. Somit kann jede Schichtdicke (bis 500 nm) durch eine Verschiebung des Signals mit der gleichen Sensitivität bestimmt werden. Die Sensitivität der Methode ist dabei groß genug, um monomolekulare Schichten zu untersuchen [132].

Mit Hilfe der SPR-Spektroskopie können dynamische und strukturelle Veränderungen dünner Filme untersucht werden. Dadurch ist es möglich, Änderungen in den optischen, thermischen, mechanischen und elektrischen Eigenschaften zu beobachten.

Allerdings sollte die Differenz der Brechungsindizes von Film und umgebenden Medium groß genug sein, da die Winkelverschiebung dieser Differenz proportional ist.

Der Nachteil der SPR-Spektroskopie besteht darin, dass die Schichtdicke und der Brechungsindex einer sehr dünnen Schicht nicht unabhängig voneinander bestimmt werden können. Eine unabhängige Bestimmung von Dicke und Brechungsindex der Schichten ist nur möglich, wenn Messwerte von anderen Charakterisierungsmethoden, zum Beispiel der Ellipsometrie in die Berechnung mit einbezogen werden können. Dann liefert die SPR-Methode sehr genaue Werte für den Brechungsindex einer Schicht.

4.4.4.2 Anwendungen der SPR-Spektroskopie auf Monoschichten

Die SPR-Spektroskopie hat sich in den letzten Jahren zu einem vielseitigen Werkzeug in der Oberflächenanalytik entwickelt. Eine typische Anwendung dabei ist die Detektion von Adsorptionsphänomenen an Oberflächen, die im Nanometerbereich liegen. Sehr häufig wurden Sorptionsvorgänge und die damit verbundene Ausbildung von dünnen Schichten an Goldsubstraten [95, 135, 136] sowie an metalloxidischen Oberflächen [109, 111, 129] untersucht. Aktuelles Interesse besteht ebenfalls in der Charakterisierung von dynamischen biologischen Prozessen an Oberflächen, so zum Beispiel bei Test zur Proteinresistenz von SAMs [9, 10, 46, 95, 133, 137] oder zur spezifischen Anbindung von Proteinen, wie Streptavidin [85].

4.4.4.3 Protokoll zur Durchführung von SPR-spektroskopischen Untersuchungen

Die Kinetik der Schichtbildung von Monoalkylphosphorsäure- und Alkylphosphonsäurederivaten, die Stabilität der Schichten sowie das Anbindungsverhalten von Proteinen wurden mit der SPR-Spektroskopie verfolgt. Die Messungen fanden an einem OWIS Modell 197 Plasmonenresonanzspektrometer, versehen mit einem EG&G Instruments 7220 DSP Lock-In Amplifier Signal-Verstärker statt.

Die verwendete SPR-Apparatur weist die folgende Messanordnung auf:

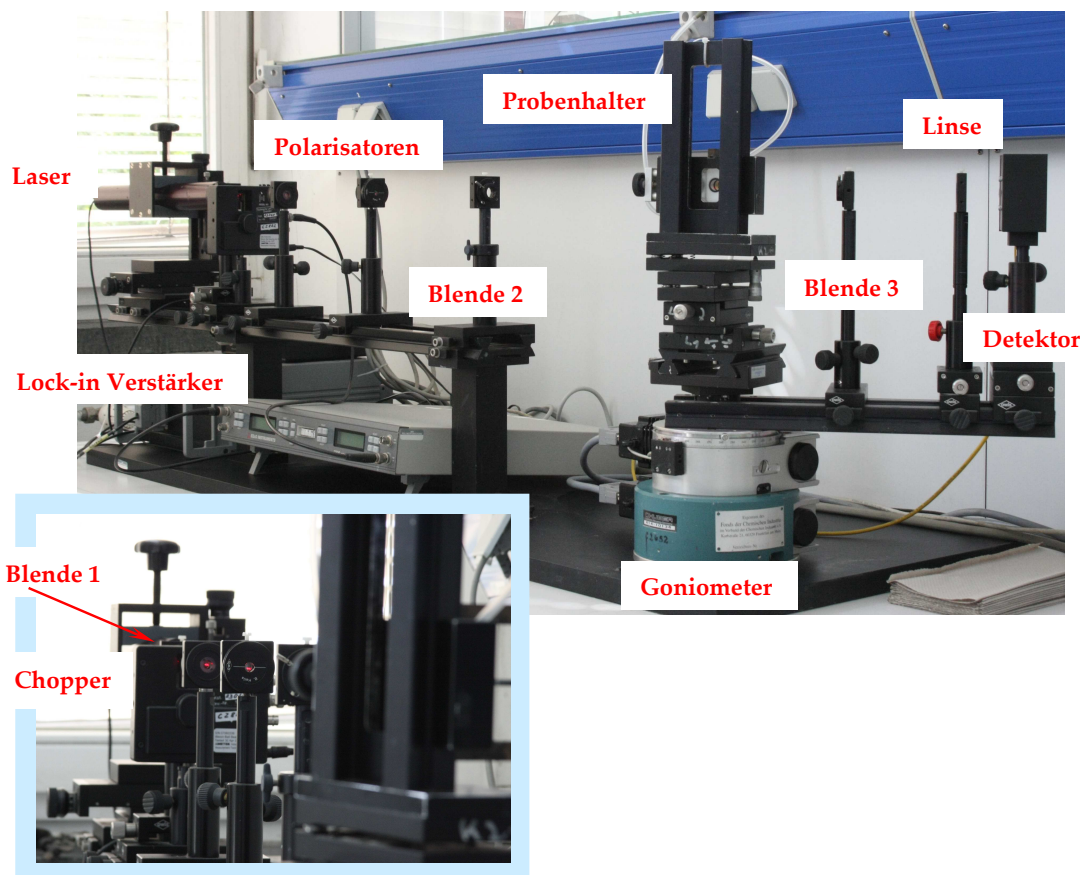


Abbildung 4-17: Aufbau der SPR-Apparatur

Mit Hilfe der SPR-Spektroskopie ist es möglich, Kinetik- und Referenzmessungen durchzuführen, ohne an dem zu untersuchenden Substrat Veränderungen zu verursachen. Dazu wurde eine speziell konstruierte Küvette aus Teflon verwendet, die einen Austausch von Lösungsmitteln, Adsorptions- sowie Pufferlösungen und Reagenzien zur Durchführung von Oberflächenreaktionen während laufender Messungen ermöglichte. Der Austausch erfolgte

über eine Spritze oder bei großen Volumina mit Hilfe einer Schlauchpumpe (Abbildung 4-18 (a)).

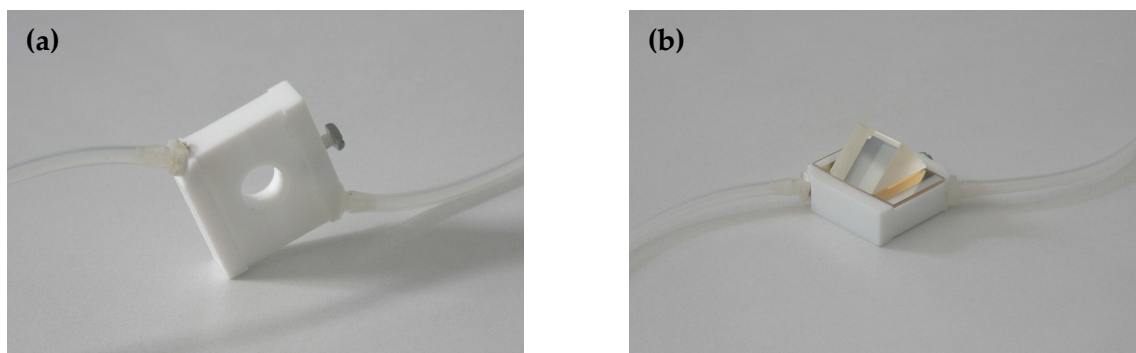


Abbildung 4-18: Teflon-Flüssigkeitsmesszelle (a); KRETSCHMANN-Konfiguration (b)

Um Adsorptions- und Desorptionsvorgänge an oxidischen Metalloberflächen (Aluminiumoxid, Titandioxid) während einer Kinetikmessung beobachten zu können, war die Messanordnung der Messzelle (Abbildung 4-18 (b)) sowie der folgende Messablauf nötig:

Tabelle 4-12: Protokoll zur Durchführung von Adsorptionsmessungen

Schritt	Prozess	Konzentration der Lösung	Vermerk
SPR 1.	Substratbeschichtung	-	Details siehe Kapitel 4.1.1
A1	Herstellung der Adsorptionslösung	10^{-3} mol/l	Details siehe Tabelle 4-2
SPR 2.	Reinigung von beschichteten Substraten	-	Details siehe Kapitel 4.3.1.2; zeitnaher Einbau des Substrates in Messzelle, anschließend Einbau und Justierung in SPR-Apparatur
SPR 3.	winkelabhängige (scan) Messung	1. gegen Luft 2. gegen reines Lösungsmittel der Adsorptionslösung	dient zur Kontrolle der Schichtparameter und als Referenz; Winkelbereiche: Luft: $18-36^\circ$ Wasser: $45-67^\circ$ Ethanol/Wasser=1:1: $47-67^\circ$
SPR 4.	Kinetikmessung	1. reines Lösungsmittel der Adsorptionslösung 2. Adsorptionslösung 3. Spülen mit reinem	erfolgt bei festgelegtem Winkel aus Scanspektrum SPR 3.2., SPR 4.1.: ca. 20min zur Equilibrierung des Systems, SPR 4.2.: Zugabe von 5 ml Adsorptionslösung durch einen

	Lösungsmittel	Spritzenfilter (Porengröße 0,2 µm) Adsorptionszeit: 16h, SPR 4.3.: zur Entfernung von physisorbierten Molekülen
SPR 5.	Scanmessung	gegen reines Lösungsmittel nach der Adsorption
		Vergleich mit Scanmessung SPR 3.2., nach Beendigung Ausbau des Substrates und Trocknung der SA- Schicht im N ₂ -Strom; zeitnahe Verwendung zu Proteinversuchen

Tabelle 4-13: Protokoll zur Durchführung von Tests zur Pufferstabilität und Proteintests

Schritt	Prozess	Konzentration der Lösung	Vermerk
SPR 1. bis SPR 5.	Adsorptionsprozess	Adsorptionslösung 10 ⁻³ mol/l	Details siehe Tabelle 4-12
SPR 6. SPR 7.1.	Scanmessung Kinetikmessung: Stabilitätstest in Pufferlösungen	1. gegen Wasser 1. Wasser 2. Pufferlösung (PBS, HEPES2 oder Tris) 3. Wasser	Winkelbereich: Wasser: 45-70° erfolgt bei festgelegtem Winkel aus Scanspektrum SPR 6. SPR 7.1.1.: 20min zur Equilibrierung des Systems, SPR 7.1.2.: Zugabe von 5 ml Pufferlösung (Details siehe Tabelle 4-3) über einen Spritzenfilter (Porengröße 0,2 µm), Auslagerungszeit: 2h SPR 7.1.3.: gründliches Spülen mit Wasser
SPR 7.2.	Kinetikmessung: Proteintest	1. Wasser 2. Pufferlösung (HEPES2) 3. Proteinlösung (100 µg Protein/ 100 ml Pufferlösung) 4. Pufferlösung 5. Wasser	Arbeitsschritte SPR 7.1.1. – SPR 7.1.2. SPR 7.2.1.: Zugabe von 5 ml Protein- lösung (Details siehe Tabelle 4-7) über Spritzenfilter, Auslagerungszeit: 20min SPR 7.2.2.: gründliches Spülen mit Pufferlösung Arbeitsschritt: SPR 7.1.3.
SPR 8.	Scanmessung	gegen Wasser	Vergleich mit Scanmessung SPR 6.

Die Versuche zur spezifischen Proteinanbindung und Oberflächenaktivierung sind in Kapitel 3.8.1 und 3.8.2 bzw. in Tabelle 4-9 und 4-10 detailliert beschrieben und können für die SPR-Spektroskopie übernommen werden.

Tabelle 4-14: Protokoll zur Durchführung von Oberflächenreaktionen

Schritt	Prozess	Konzentration der Lösung	Vermerk
SPR 1. bis SPR 5.	Adsorption von COOH-C₁₇-PO₃H₂	Adsorptionslösung 10 ⁻³ mol/l	Details siehe Tabelle 4-12
O1.	Scanmessung	gegen DMF	Winkelbereich: 53-74°
O2.	Kinetikmessung	1. DMF 2. PG bzw. HEG in DMF, DCC, DMAP 3. DMF	O2.1.: 20min zur Equilibrierung des Systems O2.2.: Zugabe Reaktionslösung über Spritzenfilter (Porengröße 2 µm), Reaktionszeit: 24h (Details siehe Kapitel 3.8.3.) O2.3.: gründliches Spülen mit 40 ml DMF (1h)
O3.	Scanmessung	gegen DMF	Winkelbereich: 53-80°; Vergleich mit O1., nach Beendigung Ausbau des Substrates und Trocknung der SA-Schicht im N ₂ -Strom
SPR 6. bis SPR 8.	Scan- und Kinetikmessungen		Test zur unspezifischen Proteinadsorption, Details siehe Tabelle 4-13

Zur Ergänzung dieser Methode und zur Gewinnung spezifischer Informationen hinsichtlich der Orientierung, Zusammensetzung und der Schichtdicke dünner Filme wurden die XPS und die Spektroskopische Ellipsometrie herangezogen, die im Folgenden beschrieben werden.

4.4.5 Spektroskopische Ellipsometrie

4.4.5.1 Methode und Messprinzip

Die Ellipsometrie ist eine Methode zur Bestimmung der Schichtdicke und des Brechungsindex dünner Filme. Dabei wird die Änderung des Polarisationszustandes des eingestrahnten, polarisierten Lichts nach erfolgter Reflexion an einer planaren, glatten Probenoberfläche bestimmt [138]. Die voneinander unabhängige Betrachtung von Parallel- und Senkrechtkomponenten liefern die Amplituden- und Phaseninformationen (Ψ und Δ). Die auf der Basis eines parametrisierten Modells simulierten Daten werden in einem Fit-Algorithmus unter Verwendung experimentell bestimmter Daten oder in Materialdatenbanken verfügbaren Daten mit den experimentellen Daten in eine bestmögliche Übereinstimmung gebracht. Diese Fit-Prozedur liefert dann für das Substrat bzw. die Monoschicht die relevanten physikalischen Größen Extinktionskoeffizient (k) und Brechungsindex (n). Zusätzlich kann die Dicke einer Schicht bestimmt werden [139]. Die Vorteile dieser Messmethode liegen in der zerstörungsfreien, berührungsfreien Messung sowie in der hohen Empfindlichkeit ($\pm 0,1$ nm). Ein spektrales Ellipsometer besteht im Allgemeinen aus einer Lichtquelle, einem Monochromator, einem Polarisator und einem Analysator, der die Polarisation des Lichtes nach der Reflexion an der Probenoberfläche misst.

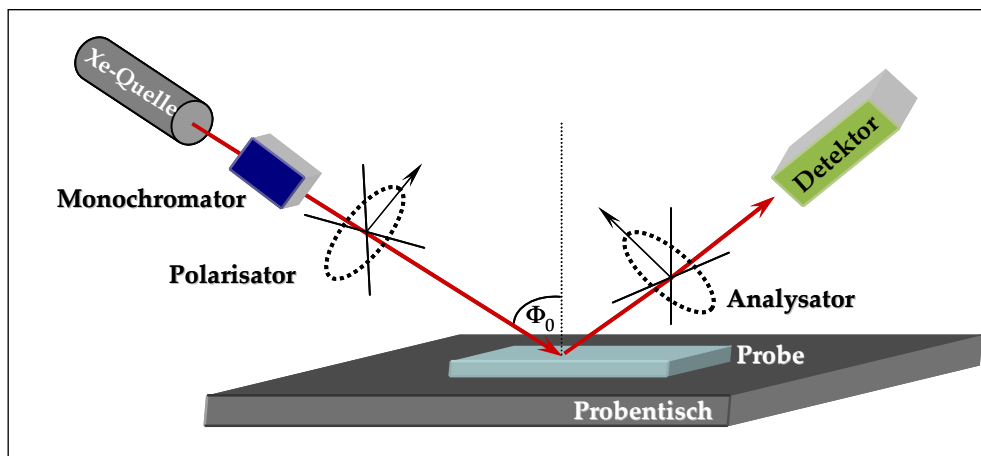


Abbildung 4-19: Schematischer Aufbau eines Ellipsometers.

Polarisiertes Licht wird unter dem Winkel Φ_0 zur Oberflächennormale auf die zu untersuchende Probe eingestrahlt. Dabei wird die Polarisation senkrecht (s) bzw. parallel (p) zur Einfallsebene betrachtet. Das Licht wird von der Probenoberfläche reflektiert und liegt in

der Regel elliptisch polarisiert vor. Die Ursache dafür ist, dass die (zur Einfallsebene) senkrechte Komponente des elektrischen Feldes (E_s) und die (zur Einfallsebene) parallele Komponente des elektrischen Feldes (E_p) verschieden stark in ihren Amplituden gedämpft und somit unterschiedlich reflektiert werden. Es resultiert eine Phasendifferenz Δ und somit elliptisch polarisiertes Licht, was dieser Methode ihren Namen gab. Die Änderung der Polarisation wird durch die relative Phasenänderung Δ und die relative Amplitudenänderung $\tan\Psi$ beschrieben.

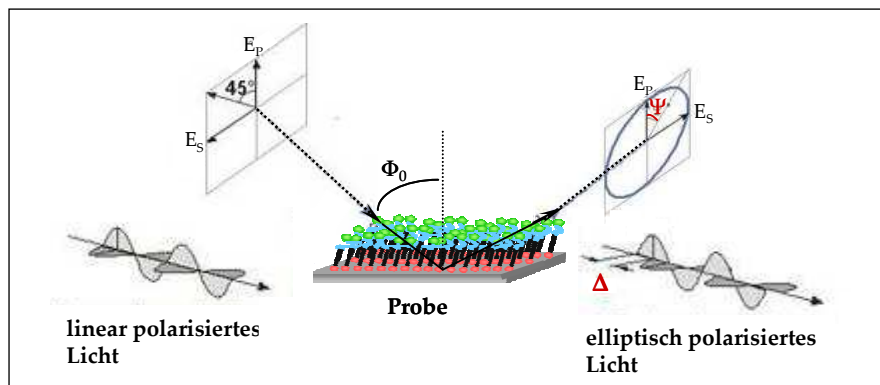


Abbildung 4-20: Schematische Darstellung der Wirkungsweise eines Ellipsometers.

Die experimentell ermittelten Daten Δ und $\tan\Psi$ stehen in Beziehung mit den FRESNEL-Reflektionskoeffizienten R_s und R_p für s- und p-polarisiertes Licht. Diese zwei Koeffizienten stellen komplexe Funktionen in Abhängigkeit vom Einfallswinkel Φ_0 , des umgebenden Mediums n_0 , des Extinktionskoeffizienten der Schicht k_j , der Wellenlänge λ , den optischen Konstanten des Substrates S , und der Brechungsindizes der Schichten n_j ($j = 0, 1, 2, \dots$ Anzahl der Schichten) und Schichtdicke d_j dar und können mit folgender ellipsometrischer Grundgleichung beschrieben werden:

Gleichung 4-8

$$\tan\Psi e^{i\Delta} = \frac{R_p}{R_s} = F(\Phi_0, \lambda, S, n_0, n_j, k_j, d_j)$$

mit $\tan\Psi = R_p/R_s$ und $\Delta = \delta_p - \delta_s$

$\tan\Psi$: relative Amplitudenänderung, Δ : relative Phasenänderung, R_s und R_p : FRESNEL-Reflektionskoeffizienten, δ_p : Phase des p-polarisierten Lichtes, δ_s : Phase des s-polarisierten Lichtes

Diese Gleichung gilt für Systeme homogener Phasen mit planaren und glatten Oberflächen. Mit Hilfe spezieller Modelle können die Oberflächenrauigkeit, Heterogenitäten sowie Anisotropien berücksichtigt werden. So werden zum Beispiel adsorbierte Monoschichten oder

Polymeroberflächen mit Hilfe der Ellipsometrie in unterschiedlichen Medien, zum Beispiel Flüssigkeiten untersucht. Die Kinetik der Schichtbildung, Adsorptions- und Desorptionsprozesse können durch die in-situ-Ellipsometrie untersucht werden [156].

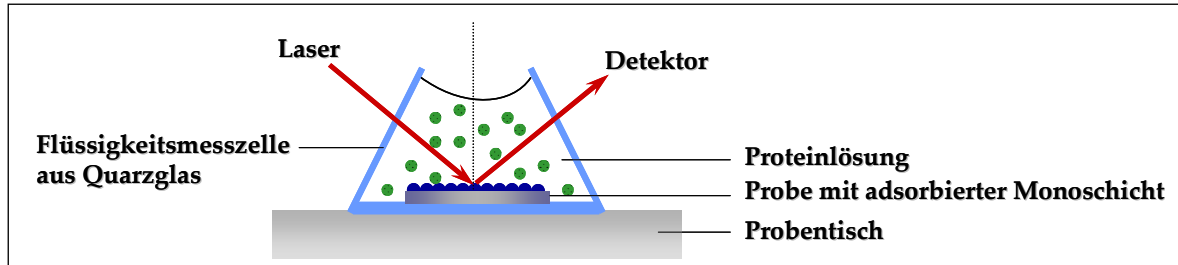


Abbildung 4-21: Schematische Darstellung einer in-situ-Oberflächenuntersuchung mittels Ellipsometrie

Dabei werden Änderungen in der Phase und Amplitude des reflektierten Lichtes zur Berechnung der Menge an adsorbierter Substanz nach *DEFEIJTER* [140] (zum Beispiel: SA-Moleküle, Proteine) aus entsprechender Lösung herangezogen.

4.4.5.2 Anwendungen der Ellipsometrie auf Monoschichten

Um die Struktur abgeschiedener dünner Schichten auf metalloxidischen Oberflächen zu verstehen, ist eine Kombination von verschiedenen Oberflächenanalysemethoden erforderlich. Die Schichtdicke [49, 141], der Brechungsindex einer Schicht [142] sowie die abgeschiedene Menge und somit die Oberflächenbedeckung [16, 140] lassen sich sehr gut mit Hilfe der spektroskopischen Ellipsometrie bestimmen.

Es wurden die spektroskopische ex-situ- als auch die in-situ-Ellipsometrie zur Charakterisierung von SA-Monoschichten und zur Kontrolle der Stabilität der Schichten gegenüber Puffersystemen sowie Proteinanbindung genutzt.

4.4.5.3 Protokoll zur Ellipsometriemessung

Ex-situ-Ellipsometrie

Schichtdickenbestimmungen der Metalloxidsubstrate wurde vor und nach einer Oberflächenmodifizierung durchgeführt und erfolgten am Institut für Materialwissenschaften an der ETH Zürich (ETHZ) sowie am Institut für Polymerforschung Dresden (IPF) mittels ellipsometrischer Untersuchungen. Es wurden die Messgeräte: VASE-Ellipsometer M-2000F™

der Firma J.A. WOOLLAM Co. Inc. Lincoln, Nebraska (ETHZ) bzw. das VASE-Ellipsometer M-2000VI™ der Firma J.A. WOOLLAM Co. Inc. Lincoln, Nebraska (IPF) genutzt. Die Auswertungen erfolgten mit der WVASE32-Software. Die Untersuchungen der „trockenen“ Schichten wurden in einem spektralen Bereich von 370-1000 nm bei den Einfallswinkeln 65°, 70° und 75° (ETHZ) bzw. 66°, 68° und 70° (IPF) bei 25°C in Luft durchgeführt. Für die Auswertung wurde das Spektrum auf ein Multilayer-Modell basierend auf der WVASE32-Software gefittet. Bei der Auswertung der Messdaten wurden die optischen Eigenschaften einer Cauchy-Schicht mit den folgenden Parametern; $A_n=1,45$, $B_n=0,01$ und $C_n=0$ [143] verwendet.

Die nach Schritt A1-A7 (Tabelle 4-7, Kapitel 4.3.2) behandelten TiO₂-Substrate wurden vor bzw. nach einer Oberflächenmodifizierung zeitnah vermessen.

In-situ-Ellipsometrie

Die Kinetik der Adsorption von Phosphonsäurederivaten sowie nachfolgende Proteinuntersuchungen konnten mittels der in-situ-Ellipsometrie verfolgt werden. Diese Untersuchungen wurden am IPF in Dresden durchgeführt. Die Messungen erfolgten in verschiedenen Lösungen an einem VASE-Ellipsometer M-2000VI™ (J.A. WOOLLAM Co. Inc. Lincoln, Nebraska) in einer Flüssigkeits-Quarzglas-Messzelle bei 20°C (Messaufbau siehe Abbildung 4-21). Zur Auswertung wurde das Spektrum auf ein Mehrschicht-Modell entsprechend der WVASE32-Software angefittet.

Die zur in-situ-Ellipsometrie Messung verwendeten TiO₂-Substrate wurden nach Kapitel 4.3.1.2 gereinigt und standen anschließend zur Adsorption und einem nachfolgenden Proteinresistenztest zur Verfügung.

Tabelle 4-15: Protokoll zur Durchführung von in-situ-Ellipsometrie Untersuchungen

Schritt	Prozess	Konzentration der Lösung	Vermerk
E1.	Bestimmung der Schichtparameter des TiO ₂ -Substrates	Ethanol/Wasser 1:1	Bestimmung von Ψ/Δ für das reine Substrat bei 65°-70°-75° gegen Luft bei 20°C; Bestimmung von Ψ/Δ für das reine Substrat in Messzelle bei 68° gegen Luft; Bestimmung von Ψ/Δ für das reine Substrat in Messzelle bei 68° gegen Ethanol/Wasser; Bestimmung des Brechungsindex n Ethanol/Wasser 1:1 bei 68°;
E2.	Kinetikmessung Adsorption von COOH-C₁₇-PO₃H₂ bzw. COOH-EG₃-C₁₇-PO₃H₂	Adsorptionslösung 10 ⁻³ mol/l (Ethanol/Wasser 1:1)	Zugabe der Adsorptionslösung = Start der Kinetikmessung (dynamic scan); Adsorptionszeit: 16h, bei 68° und 20°C; Beobachtung der Zunahme der Schichtdicke; vorherige Bestimmung des Brechungsindexinkrementes der Adsorptionslösung mittels dynamischer Lichtstreuung
E3.	Spülen der Messzelle	1. Ethanol/Wasser 2. Ethanol/Wasser	Schichtdickenbestimmung der SA-Schicht
E4.	Zugabe der Pufferlösung	HEPES2	Quellung der Monoschicht; Equilibrierung des Systems; Schichtdickenbestimmung; Start der Kinetikmessung bei 68°; spätere Bestimmung des Brechungsindex des Puffersystems mit Ellipsometrie
E5.	Zugabe der Proteinlösung	BSA (100 µg/100 ml Pufferlösung)	Kinetikmessung bei 68° und 20°C
E6.	Spülen der Messzelle	1. HEPES2 2. HEPES2	Schichtdickenbestimmung der Proteinschicht
E7.	Reinigung der Messzelle	NH ₃ /H ₂ O/H ₂ O ₂ 1:1:5	20min bei 60°C, gründliches Spülen mit destilliertem Wasser; Trocknung im Trockenschrank

4.4.6 Röntgen-Photoelektronen-Spektroskopie (XPS oder ESCA)

4.4.6.1 Methode und Messprinzip

Die Röntgen-Photoelektronen-Spektroskopie ist eine wichtige oberflächenanalytische Methode mit hoher Nachweisgrenze. Die Ausdringtiefe der Photoelektronen beträgt bei Metallen 0,4 – 2 nm, bei organischen Oberflächen 2 – 10 nm, das bedeutet, dass eine nur wenige Atomlagen dicke Schicht weitgehend zerstörungsfrei erfasst wird. Eine Degradation ist bei längerer Einwirkzeit der Röntgenstrahlung oder bei empfindlichen Substanzen zu beobachten [157].

Ein Röntgen-Photoelektronen-Spektrometer ist aus folgenden drei Baueinheiten: der Röntgenröhre, dem eigentlichen Spektrometer und der Vakuumeinheit aufgebaut. Eine in einer Röntgenröhre erzeugte charakteristische Röntgenstrahlung (Mg K_α oder Al K_α , auch monochromatisiert) mit bekannter Energie (für Al K_α -Strahlung: 1486 eV; für Mg K_α -Strahlung: 1253,6 eV) trifft auf die Substratoberfläche und dringt tief in das Substrat ein. Neben verschiedenen Prozessen (Augereffekt, Röntgenfluoreszenz, Absorption, etc.), die in Konkurrenz zueinander stehen, findet auch der innere photoelektrische Effekt statt. Das heißt, es werden Elektronen aus den kernnahen Orbitalen und aus Valenzorbitalen herausgeschlagen. Die hohe Primärenergie der Röntgenstrahlung verleiht den Photoelektronen eine kinetische Energie, die es ihnen ermöglicht, den Atomverband und somit die Substratoberfläche zu verlassen. Die Röntgenröhre und der Detektor sind in der XPS-Apparatur in einem Winkel von 45° zueinander eingebaut. Um eine winkelabhängige Messung durchzuführen, wird die Probenoberfläche im Röntgenstrahl geneigt. Der Detektor erfasst dabei nur die Photoelektronen, die die Probenoberfläche unter einen definierten Winkel verlassen. Diese Elektronen stammen in Abhängigkeit vom Winkel aus unterschiedlichen Tiefenbereichen der Probe. Somit kann eine Charakterisierung der Schicht senkrecht zur Oberfläche erfolgen.

Mit Hilfe des Spektrometers erfolgt die Bestimmung der kinetischen Energie sowie der Anzahl der austretenden Photoelektronen. Aus der Differenz zwischen bekannter Primärenergie und der gemessenen kinetischen Energie ergibt sich die Bindungsenergie der jeweiligen Elektronen.

Gleichung 4-9

$$E_B = h\nu - E_{kin}$$

E_B : Bindungsenergie des K-Elektrons, h: PLANCKsches Wirkungsquantum, ν : Frequenz,
 E_{kin} : kinetische Energie des Photoelektrons

Da die Bindungsenergie der Elektronen für jedes Orbital eines jeden Elements charakteristisch ist, kann daraus auf die Herkunft bezüglich der Atomart und der Elektronenorbitale der Elektronen geschlossen werden. Diese Tatsache gilt aber nur für Photoelektronen von Atomen, die sich nahe der Substratoberfläche befinden. Die Tiefe, aus der noch messbare Intensitäten an Elektronen vordringen, ist sehr begrenzt und liegt zwischen 5-10 nm. Photoelektronen, die aus der Bulkphase des Substrates stammen, dissipieren ihre kinetischen Energien durch Stoßprozesse an den Elektronenhüllen anderer Atome und tragen somit zum kontinuierlichen Untergrund des Spektrums bei. Die Anzahl der von einer Atomsorte emittierten Photoelektronen steht in einem funktionellen Zusammenhang mit der Anzahl der Atome auf der Probenoberfläche bzw. oberflächennahen Bereich. Das Auszählen der Photoelektronen durch die Channeltrons des Spektrometers ermöglicht neben der qualitativen Aussage auch eine quantitative Aussage über die chemische Zusammensetzung der Probenoberfläche bzw. oberflächennahen Bereiche.

Die chemische Umgebung eines Atoms beeinflusst die energetische Lage der Elektronen. Elektronegative Elemente ziehen Elektronendichte vom Atom ab und verursachen demzufolge eine positive Partialladung am Atom. Für das Entfernen von Photoelektronen aus positivierten Atomen wird mehr Energie benötigt, d.h. der Anteil an kinetischer Energie, die ein Photoelektron vom primären Röntgenquant verliehen bekommt, wird im Gegensatz zu partiell nicht positivierten Atomen kleiner. Analog dazu erhöhen die elektronenpositiven Elemente die Elektronendichte am Atom und führen somit zu einer energetischen Absenkung des photoelektrischen Effekts.

Die sich ergebenden Verschiebungen der Peaklagen im Spektrum lassen Schlussfolgerungen über die chemische Umgebung einer Atomsorte zu. So können zum Beispiel verschiedene Bindungszustände von C-Atomen als Carboxyl-, Carbonyl- oder Ketogruppe nachgewiesen werden.

Anhand winkelabhängiger XPS-Messungen können aufgrund der geringen Ausdringtiefe der erzeugten Photoelektronen Aussagen über die Elementverteilung der Probe normal zur Oberfläche gemacht werden. Bei einer winkelabhängigen XPS-Messung werden die Intensitäten der ausgewählten Markeratome (zum Beispiel: P, N) ins Verhältnis gesetzt und gegen den Detektorwinkel aufgetragen. Nimmt das P/N Verhältnis mit steigendem Winkel zu, so kann daraus geschlossen werden, dass das P-Atom bzw. die Phosphonsäuregruppe auf der

Substratoberfläche adsorbiert hat und das N-Atom auf der Adsorbatschicht, d.h. am weitesten von der Substratoberfläche entfernt liegt.

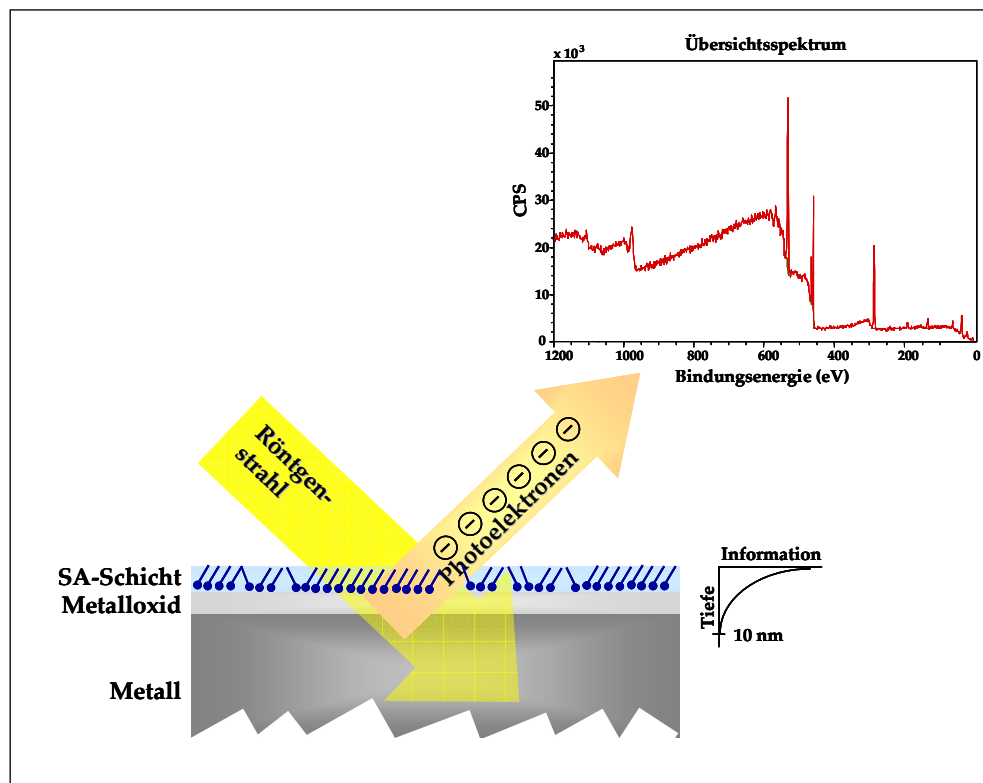


Abbildung 4-22: Prinzip der XPS [18].

4.4.6.2 Anwendung der XPS auf Monoschichten

In zahlreichen Untersuchungen wurden Monoschichten auf Substratoberflächen mittels XPS-Messungen untersucht und charakterisiert. *Hofer* [144], *Busch* [129] und *Tosatti* [50] zeigten in ihren Arbeiten XPS-Ergebnisse, die aus Messungen adsorbierter dünner Schichten aus amphiphilen Alkylphosphon- und Alkylphosphorsäuren auf Al-, Ti-, Ta- und Nb-Substraten resultierten. Die Messungen erfolgten sowohl bei 45° als auch winkelabhängig im Bereich von 15° - 90°. Aus den erhaltenen Spektren und den berechneten Bindungsenergien konnten Rückschlüsse auf die Bindungszustände von C-, O- und P-Atomen gezogen sowie das Verhältnis der elementaren Zusammensetzung der Probe normal zur Oberfläche des Substrates und somit die Orientierung der entsprechenden Adsorbate auf den Substraten bestimmt werden.

4.4.6.3 Protokoll zur XPS-Messung

Die modifizierten Metalloxidoberflächen wurden mit der hochaufgelösten sowie winkelabhängigen XPS-Messung am Institut für Materialwissenschaften an der ETH Zürich sowie am Institut für Halbleiter- und Mikrosystemtechnik (IHM) der TU Dresden untersucht. Die Messungen an der ETHZ erfolgten an einem VG Theta Probenspektrophotometer (Thermo Electron Corporation, West Sussex, UK) Das Messgerät ist ausgestattet mit einem konzentrisch hemisphericalen Analysator und einem zwei-dimensionalen Channel-Plate-Detektor mit 112 Energie und 96 Winkel Kanälen. Die Spektren wurden unter einem Vakuum von $\geq 5 \times 10^{-9}$ mbar sowie durch Nutzung einer monochromatischen Al- K_{α} -Quelle mit einem Punktdurchmesser von 300 μm aufgenommen. Die Messungen am IHM wurden an einem Photoelektronenspektrometer der Fa. Physical Electronics ESCA 5700 durchgeführt. Als Quelle diente eine nicht monochromatisierte Mg K_{α} - Strahlung bei 350 W. Der Arbeitsdruck lag bei $8 \cdot 10^{-10}$ bis $1 \cdot 10^{-9}$ Torr.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm Casa-XPS [Version 2.3.5 www.casaxps.com]. Die Peaks im Detailspektrum wurden durch Peakzerlegung unter Verwendung der Gaussian/Lorentzian Funktion (60/40) zugeordnet. Die Bindungsenergie (BE) des Alkyl-C1s Emissionspeak wurde auf 285,0 eV kalibriert. Vor der Auswertung der Flächen wurde eine Shirley-Untergrund-Korrektur durchgeführt [158, 159]. Im Allgemeinen erfolgte die Analyse der Substrate bei einem Winkel von 45°. Die Detektoreinstellungen für die winkelabhängigen Messungen betrug 12°, 22°, 32°, 52° and 62°.

Die zur Messung verwendeten TiO₂-Substrate wurden einer Behandlung nach Schritt A1-A7 (Tabelle 4-7, Kapitel 4.3.2) unterzogen und zeitnah vermessen.

5. Ergebnisse und Diskussion

5.1 Synthese

Die Synthesen der SA-fähigen Moleküle (detaillierte Durchführung siehe Kapitel 3) sollen nun hinsichtlich ihrer Reproduzierbarkeit der Literaturangaben, Ausbeuten, Produktreinheiten und besonders aufgetretener Schwierigkeiten diskutiert werden. Wenn verschiedene Reaktionswege für einen Schritt durchgeführt wurden, erfolgt eine Wertung der Varianten.

Es wurden maßgeschneiderte, SA-fähige Moleküle aus in der Literatur bereits bekannten Synthesestufen dargestellt. Eine neue Kombination dieser Reaktionen sowie die Variation der Reaktionsparameter führten zu neuartigen, in der Literatur noch nicht beschriebenen Verbindungen.

5.1.1 Darstellung der Verbindungen **COOH-EG₃-C₁₁-PO₄H₂** und **COOH-EG₃-C₁₇-PO₄H₂**

Bei der Darstellung der Verbindungen **COOH-EG₃-C₁₁-PO₄H₂** und **COOH-EG₃-C₁₇-PO₄H₂** handelte es sich um Mehrstufensynthesen, die fünf bzw. sechs Reaktionsschritte umfassten. Die erste Reaktionsstufe diente zum Aufbau des Spacers, einer Alkylkette, die 17 CH₂-Wiederholeinheiten besitzt und somit nur für die Darstellung der Verbindung **COOH-EG₃-C₁₇-PO₄H₂** notwendig war. Da die Ausgangssubstanz 17-Brom-1-heptadecen kommerziell nicht erhältlich ist, konnte sie über die Durchführung einer Grignard-Reaktion und einer anschließenden Kupplungsreaktion dargestellt werden. Die Reaktionsführung wurde der Literatur [103] entnommen. Um die anfängliche Ausbeute von 41% zu optimieren, erfolgte die Durchführung der Kupplungsreaktion unter Argonatmosphäre, Ausschluss von Wasser sowie während der Zugabe der einzelnen Reagenzien unter Eiskühlung. Außerdem wurde

die Reaktionszeit der Kupplungsreaktion von 16h auf 150h erhöht, was zu einer Steigerung der Ausbeute auf 69% führte, die Literatursausbeute betrug 66%. Eine optimale Reinheit des Produktes konnte erst nach zweimaliger Durchführung der Säulenchromatographie mit n-Hexan erzielt werden, wodurch ein merklicher Ausbeuteverlust auftrat.

Die nachfolgenden beiden Reaktionsstufen beschrieben nucleophile Substitutionsreaktionen, die nach dem Mechanismus einer Williamson'schen Ethersynthese verliefen. Ausgehend vom Tri(ethylenglykol) wurde zunächst der Alkylspacer eingeführt und im anschließenden Reaktionsschritt die geschützte funktionelle Gruppe, der *tert*-Butylester, an das Tri(ethylenglykol) substituiert. Die Synthesevorschrift für den ersten Reaktionsschritt konnte, wie sie in der Literatur [8] für das Di(ethylenglykol) beschrieben stand, auf das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Tri(ethylenglykol) übertragen werden, die Reaktionstemperatur für die Optimierung der Ausbeute stammte aus der Literatur [36]. Während der Reaktion wurde ein fünffacher Überschuss an Tri(ethylenglykol) mit 11-Brom-1-undecen umgesetzt, um eine Monosubstitution zu bevorzugen. Die für diese Reaktion wichtige reaktive Zwischenstufe, das Natriumalkoholat, wurde durch die Reaktion des Tri(ethylenglykols) mit Natriumhydrid hergestellt. Ein Arbeiten mit diesen sehr wasserempfindlichen Substanzen erforderte eine Reaktionsführung unter strengstem Ausschluss von Feuchtigkeit, weil sonst die unerwünschte Reaktion von Natriumhydrid mit Wasser ablaufen würde, was zu einer enormen Verminderung der Ausbeute führt. Das bedeutete für die Reaktionsführung, dass das stark hygroskopische Tri(ethylenglykol) unmittelbar vor Beginn der Reaktion 24h im Vakuumtrockenschrank über Molekularsieb getrocknet werden musste. Die Reaktionsapparatur wurde mehrfach evakuiert, ausgeheizt und mit Argon gespült sowie ultratrockene Lösungsmittel verwendet. Unter Einhaltung dieser Maßnahmen konnte schließlich eine Ausbeute von 76% erzielt werden, die Literatursausbeute betrug 63%. Die Reinigung des Produktes erfolgte nach einer Optimierung des Laufmittelgemisches über eine säulenchromatographische Trennung. Die erhaltenen Verbindungen lagen in spektroskopischer Reinheit vor.

Die Maßnahmen zum Ausschluss von Feuchtigkeit, die während der Reaktionsführung des ersten Syntheseschrittes angewendet wurden, mussten ebenfalls für die nachfolgenden Reaktionsstufen beachtet werden, da ansonsten mit einer starken Verminderung der Ausbeute zu rechnen war.

Der nächste Reaktionsschritt, der zur Einführung der funktionellen Gruppe und somit zur Darstellung eines disubstituierten Tri(ethylenglykol)-Allylethers diente, wurde nach der Literaturvorschrift [6] durchgeführt. Dieser Reaktionsschritt bildete die Voraussetzung zur Carboxylendgruppen-Funktionalisierung im weiteren Reaktionsverlauf. Die Darstellung dieser Verbindungen verlief problemlos, die Literaturlausbeute von 71% konnte mit 82% für die kurzkettige und 77% für die langkettige Verbindung übertroffen werden. Die Produkte lagen ebenfalls in spektroskopischer Reinheit vor.

Im weiteren Reaktionsverlauf war es notwendig, mit einer geschützten Endgruppe zu arbeiten, um ungewünschte und unkontrollierte Umsetzungen dieser reaktiven Gruppe mit anderen Reagenzien zu vermeiden. Während der Hydroborierung wurde an der endständigen Doppelbindung des Alkylspacers ein endständiger Alkohol gebildet. Diese Reaktion verlief nach der Literaturvorschrift [145] bzw. [106]. Zunächst erwies sich die Darstellung und Isolierung des Reaktionsproduktes als äußerst schwierig, da sich neben der gewünschten Verbindung sehr viele Nebenprodukte bildeten. Dies wirkte sich auch erheblich auf die Ausbeute in diesem Reaktionsschritt (20%) aus, die aber durch eine Optimierung und schließlich exakten Einhaltung der Reaktionsbedingungen, wie Temperatur und Reaktionszeit, bis auf den Wert der Literaturlausbeute von 93% für die kurzkettige Verbindung gesteigert werden konnte. Die Ausbeute der langkettigen Verbindung betrug nach einer Optimierung der Reaktionsparameter lediglich 74%. Der Grund für die generell niedrigeren Ausbeuten der langkettigen Verbindung im Vergleich zur Kurzkettigen lag in der Alkylkettenlänge. Mit zunehmender Kettenlänge des Alkylspacers nahm die Reaktivität der Moleküle ab.

In der nachfolgenden Synthesestufe wurde der endständigen Alkohol durch die Reaktion mit Phosphoroxychlorid in Gegenwart eines säurebindenden tertiären Amins zum Phosphat nach der Vorschrift [107] umgesetzt. Bei dieser Reaktion erwies es sich als äußerst wichtig, die exakten Reaktionsbedingungen einzuhalten, da sonst unerwünschte Nebenprodukte gebildet und somit die Ausbeute vermindert wurde. Als Nebenprodukte können durch eine Erwärmung der Reaktionsmischung oberhalb der Raumtemperatur, vor allem Alkylchloride sehr leicht gebildet werden. Um hohe Ausbeuten an den jeweiligen Produkt (68%; Literatur: 65%) zu erreichen, erwies es sich als notwendig, unter Feuchtigkeitsausschluss und bei einer Reaktionstemperatur von 0°C – 20°C zu arbeiten. Die *tert*-Butylestergruppe der kurzkettigen Verbindung konnte im Rahmen der Aufarbeitung des Reaktionsgemisches unter Einhaltung

von pH 1 bereits entschützt und zur freien Carbonsäure umgesetzt werden. Die Reinigung der Produkte erfolgte nach einer Optimierung der Laufmittel stufenweise über die Säulenchromatographie.

Die letzte Reaktionsstufe umfasste die Entschätzung des *tert*-Butylesters der langkettigen Verbindung zur freien Säure und somit die Bildung der terminalen funktionellen Gruppe. Da eine Entschätzung aufgrund der langen und somit reaktionsträgeren Alkylkette während der vorhergehenden Reaktionsstufe nicht möglich war, wurden an dieser Stelle mehrere Reaktionswege getestet. Nach *Whitesides et al.* [146] erfolgte die Entschätzung des *tert*-Butylesters durch die Umsetzung der geschützten Verbindung mit Trifluoressigsäure. Nach einer Reaktionszeit von 5h bei Raumtemperatur wurde ein Feststoff erhalten, der mittels NMR- sowie IR-Spektroskopie als eine unerwünschte Verbindung identifiziert werden konnte. *Harikishan et al.* [147] beschrieb eine äußerst milde und selektive Reaktionsführung mit Montmorillonit KSF. Der aus dieser Reaktion resultierende Feststoff wurde mit Hilfe der NMR-Spektroskopie untersucht und als unerwünschte Verbindung identifiziert. Die *tert*-Butyl-Schutzgruppe der Verbindung $(\text{CH}_3)_3\text{COOC-CH}_2\text{-(OCH}_2\text{-CH}_2)_3\text{-O-(CH}_2)_{17}\text{-O-PO(OH)}_2$ konnte schließlich bei einer Reaktionsführung im stark sauren Medium (pH 1) bei 50°C erfolgreich entfernt und somit die freie Carbonsäure dargestellt werden. Die Reinigung erfolgte durch Umkristallisation. Es konnte eine Ausbeute von 95% erzielt werden.

5.1.2 Darstellung der Verbindungen $\text{COOH-EG}_3\text{-C}_{11}\text{-PO}_3\text{H}_2$ und $\text{COOH-EG}_3\text{-C}_{17}\text{-PO}_3\text{H}_2$

Die Verbindungen $\text{COOH-EG}_3\text{-C}_{11}\text{-PO}_3\text{H}_2$ und $\text{COOH-EG}_3\text{-C}_{17}\text{-PO}_3\text{H}_2$ sind SA-fähige Alkylphosphonsäurederivate, die ebenfalls über Mehrstufensynthesen (sechs bzw. sieben Reaktionsstufen) dargestellt werden konnten. Die Reaktionsführung zur Darstellung der Verbindungen $\text{COOH-EG}_3\text{-C}_{11}\text{-PO}_3\text{H}_2$ und $\text{COOH-EG}_3\text{-C}_{17}\text{-PO}_3\text{H}_2$ verlief identisch zur Darstellung der Verbindungen $\text{COOH-EG}_3\text{-C}_{11}\text{-PO}_4\text{H}_2$ und $\text{COOH-EG}_3\text{-C}_{17}\text{-PO}_4\text{H}_2$ bis zur Stufe der Hydroborierung (siehe Abbildung 3-4).

Der endständige Alkohol aus der Hydroborierungsreaktion konnte in der nachfolgenden Finkelstein-Reaktion über das Tosylat zum Bromid nach [101] umgesetzt werden. Dabei war eine Reaktionsführung unter Argon, in weitestgehend trockener Atmosphäre sowie mit frisch destilliertem Dichlormethan erforderlich, um Ausbeuten von 65% für die kurzkettige

bzw. 67% für die langkettige Verbindung zu erzielen (Literaturausbeute: 52%). Diese Reaktion verlief ohne Probleme. Die Produkte lagen in spektroskopischer Reinheit vor.

In der sich anschließenden Michaelis-Arbuzov-Reaktion erfolgte die Darstellung der Monophosphonsäuren **COOH-EG₃-C₁₁-PO₃H₂** und **COOH-EG₃-C₁₇-PO₃H₂** aus den entsprechenden terminalen Bromiden mit *tris*-Trimethylsilylphosphit [108, 109]. Es erfolgte gleichzeitig die Entschützung des *tert*-Butylesters der kurzkettigen Spezies zur Zielverbindung **COOH-EG₃-C₁₁-PO₃H₂**. Die Entschützung der Verbindung **(CH₃)₃-C-OOC-CH₂-(OCH₂-CH₂)₃-O-(CH₂)₁₇-PO₃H₂** war in dieser Synthesestufe aufgrund der langen Alkylkette und der damit verbundenen geringeren Reaktivität nicht möglich. Dieser Reaktionsschritt wurde hinsichtlich der Reaktionstemperatur und -zeit sowie der Menge an *tris*-Trimethylsilylphosphit so optimiert, das Ausbeuten von 92% für die kurzkettige Verbindung und 81% für die langkettige Verbindung erfolgreich sowie spektroskopisch rein erzielt werden konnten (Ausbeute der Literatur: 81%).

Die letzte Reaktionsstufe umfasste wie bei der Darstellung der Verbindung **COOH-EG₃-C₁₇-PO₄H₂** die Entschützung des *tert*-Butylesters zur freien Säure. Die Reaktionsführung war identisch. Es konnte erfolgreich die Verbindung **COOH-EG₃-C₁₇-PO₃H₂** spektroskopisch rein aufgrund von Umkristallisation und einer Ausbeute von 93% erzielt werden.

5.1.3 Darstellung der Verbindungen **NH₂-EG₃-C₁₁-PO₃H₂** und

NH₂-EG₃-C₁₇-PO₃H₂

Die Reaktionsführung zur Darstellung der Verbindungen **NH₂-EG₃-C₁₁-PO₃H₂** und **NH₂-EG₃-C₁₇-PO₃H₂** verlief identisch zur Darstellung der Verbindungen **COOH-EG₃-C₁₁-PO₄H₂** und **COOH-EG₃-C₁₇-PO₄H₂** bis zur Einführung der funktionellen Gruppe und umfasste insgesamt sechs bzw. sieben Reaktionsstufen.

Die Einführung der phthalimidgeschützten Aminogruppe, d.h. der funktionellen Gruppe erfolgte über die Mitsunobu-Reaktion. Die Reaktionsführung verlief prinzipiell nach der Literaturvorschrift [105]. Eine Ausbeuteoptimierung konnten durch den Einsatz von Schutzgas sowie von Schlenkgefäßen während des LöSENS und der Zugabe der Reagenzien erzielt werden. Des Weiteren war auf eine genaue Einhaltung der Reaktionstemperatur zu achten. Durch eine Optimierung der Reaktionszeiten von 60 min auf 16h konnte für die langkettige Verbindung eine Ausbeutesteigerung von 63% auf 90% erzielt werden. Die

kurzkettige Spezies wurde mit einer Ausbeute von 86% (Literatur: 90%) erfolgreich dargestellt.

Die sich anschließende Hydroborierungsreaktion diente der Umsetzung der endständigen Doppelbindung des Alkylspacers in einen endständigen Alkohol. Die Reaktionsführung verlief identisch zur Darstellung der Verbindungen **COOH-EG₃-C₁₁-PO₄H₂** und **COOH-EG₃-C₁₇-PO₄H₂**. Es wurden Ausbeuten für die kurzkettige Spezies von 72% und für die langkettige Verbindung von 67% erzielt (Literaturausbeute: 90%).

Die terminale Hydroxygruppe konnte in der nachfolgenden Finkelstein-Reaktion über das Tosylat zum Bromid umgesetzt werden. Das endständige Bromid reagierte in der Michaelis-Arbuzov-Reaktion mit *tris*-Trimethylsilylphosphit und einer anschließenden Hydrolyse zur Phosphonsäure. Die Reaktionsführung dieser Stufen verlief identisch zur Darstellung der Verbindungen **COOH-EG₃-C₁₁-PO₃H₂** und **COOH-EG₃-C₁₇-PO₃H₂** und wurde bereits unter Kapitel 5.1.2 diskutiert. Es wurden folgende Ausbeuten erzielt:

Tabelle 5-1: Gegenüberstellung der Ausbeuten aus der Finkelstein- und Michaelis-Arbuzov-Reaktion im Vergleich mit den Literaturausbeuten

Verbindung	Ausbeute [%]	
	Finkelstein-Reaktion	Michaelis-Arbuzov-Reaktion
NH₂-EG₃-C₁₁-PO₃H₂	72	78
NH₂-EG₃-C₁₇-PO₃H₂	67	42
Literatur	85 ¹⁾	81 ²⁾

¹⁾ Literatur [101]; ²⁾ Literatur [108, 109]

Die Ausbeuten der langkettigen Spezies wichen stark von den Ausbeuten, die für die kurzkettige Verbindung erzielt wurden, ab. Um die Resultate der beiden Zwischenstufen der C₁₇-Spezies zu erhöhen, müssen die Reaktionsbedingungen, wie Temperatur und Zeit weiter variiert werden.

Die letzte Reaktionsstufe umfasste die Entschützung des Phthalimides zur Aminogruppe. Die Reaktionsführung dieser Synthesestufe verlief problemlos und konnte direkt aus der Literatur [105] entnommen werden. Eine Reinigung des Produktes war sehr gut durch Umkristallisation möglich. Die Ausbeuten betrugen 89% bzw. 83% (Literatur: 90%).

5.1.4 Darstellung der Verbindung COOH-C₁₇-PO₃H₂

Die Entwicklung der Synthesestrategie zur Darstellung des Templatmoleküls COOH-C₁₇-PO₃H₂ erfolgte bereits im Rahmen der Diplomarbeit von A. Ziegler [111]. Die dazu notwendigen Synthesestufen wurden in der vorliegenden Arbeit entwickelt sowie optimiert. Das Synthesekonzept umfasste vier Reaktionsstufen. Ausgehend von der Grignard- und Kupplungsreaktion, die zu Verlängerung der Alkylkette des Spacers diente, wurde im zweiten Reaktionsschritt die terminale Doppelbindung durch eine Hydroborierung zum endständigen Alkohol umgesetzt. An der Hydroxygruppe konnte anschließend durch eine Williamson'sche Ethersynthese die durch einen *tert*-Butylester geschützte Carboxylgruppe eingeführt werden. Das terminale Bromid wurde in der Michaelis-Arbuzov-Reaktion zur Phosphonsäuregruppe umgesetzt und gleichzeitig die funktionelle Gruppe entschützt. Insgesamt war die Darstellung von sechs neuen SA-fähigen Molekülen sehr zeitaufwendig aber erfolgreich. Sie konnten mit hohen Ausbeuten und einem entsprechenden spektroskopischen Reinheitsgrad synthetisiert werden und standen somit nachfolgenden Adsorptionsversuchen auf metalloxidischen Oberflächen zur Verfügung.

5.2 Oberflächencharakterisierung

Als metalloxidische Oberflächen zur Anbindung der unter Kapitel 5.1 diskutierten Verbindungen wurden die folgenden Substrate verwendet: TiO₂/Si-Wafer, TiO₂/Au/Glas, Al₂O₃/Au/Glas sowie strukturierte TiO₂/SiO₂-Oberflächen. Die Oberflächenvorbehandlung wurde immer nach einem optimierten Standardregime durchgeführt, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Die Reinigungsprotokolle zu den unterschiedlichen Substraten sind unter Kapitel 4.3 aufgeführt. Nach der Reinigung wurden mit Hilfe von Kontaktwinkel-messungen und Mikrotropfenanalyse die hohe Reinheit sowie die Reaktivität der Oberflächen aufgrund ihres stark hydrophilen Verhaltens bestätigt. Des Weiteren erfolgte eine genaue Bestimmung der Oberflächenbeschaffenheit über AFM-Messungen. Die dabei ermittelten Oberflächenrauigkeitsparameter für die verwendeten Substrate sind in Tabelle 5-2 zusammengefasst. Abbildung 5-1 zeigt zwei topographische AFM-Bilder für einen mit

Titandioxid bedampften Siliziumwafer sowie ein mit Titandioxid/Gold bedampftes LaSFN9-Glassubstrat.

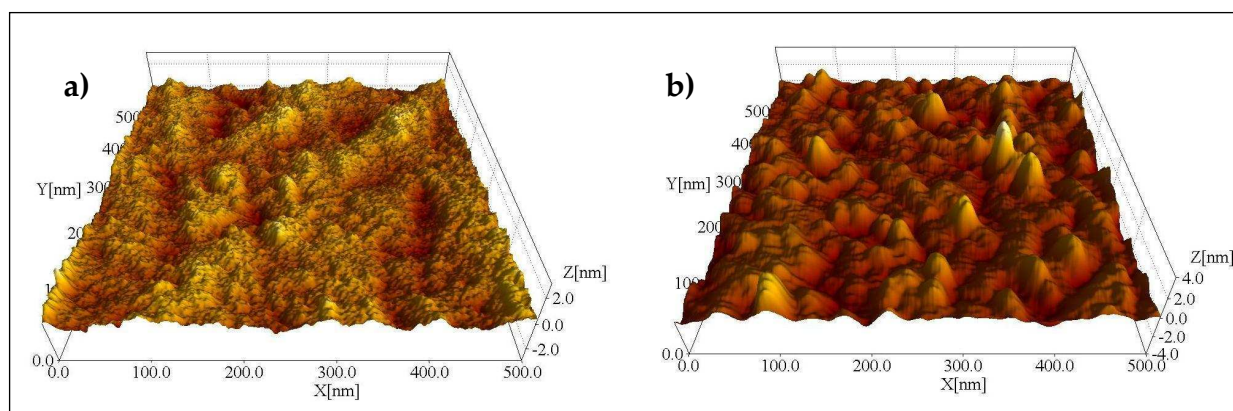


Abbildung 5-1: AFM-Bilder von a) TiO₂/Si-Wafer und b) TiO₂/Gold/Glas; Scanfläche: 0,5x0,5 µm

Tabelle 5-2: Eigenschaften und Oberflächenrauigkeit von verschiedenen Substraten, bestimmt durch AFM-Messungen im Kontakt-Modus; Scanfläche: 0,5x0,5 µm

Substrat	Beschichtung	Eigenschaften	Charakterisierung	R _a	R _q
Si-Wafer	-	-	-	0,07 nm ¹⁾	0,11 nm ¹⁾
Si-Wafer	20 nm TiO ₂	sehr glatte Oberfläche, Substratgröße variabel	Kontaktwinkel, Ellipsometrie, XPS	0,47 nm	0,63 nm
Glas	-	-	-	2,49 nm ²⁾	3,40 nm ²⁾
Glas	45 nm Au	-	-	1,09 nm ²⁾	1,49 nm ²⁾
Glas	45 nm Au, 2,5 nm TiO ₂	transparent, keine optisch dichte, glatte Oberfläche	SPR-Spektroskopie	1,27 nm	1,34 nm
Glas	45 nm Au, 2,5 nm Al ₂ O ₃	transparent, keine optisch dichte, glatte Oberfläche	SPR-Spektroskopie	1,07 nm	1,33 nm

¹⁾ Werte aus Dissertation von S. Tosatti [121]; ²⁾ Werte aus Dissertation G. Busch [129]

Aus den Werten der Tabelle 5-2 geht hervor, dass es sich bei den TiO₂-Wafeln um sehr glatte Oberflächen handelte, die eine sehr gute Voraussetzung zur Durchführung von Adsorptionuntersuchungen bildeten und demzufolge reproduzierbare Ergebnisse lieferten. Die beschichteten Glassubstrate wiesen keine optisch dichten als auch keine glatten

Oberflächen auf. Die Qualität dieser Substrate reichte aber zur Durchführung von ersten grundlegenden Versuchen völlig aus. Wie die SPR-spektroskopischen Untersuchungen (Kapitel 5.3.1.6) zeigten, konnten reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden.

Zur Ermittlung der Oberflächenbeschaffenheit der strukturierten Substrate wurden ebenfalls AFM-Messungen (Abbildung 5-2 (b)) sowie Aufnahmen mit einem Polarisationsmikroskop (Abbildung 5-2 (a)) durchgeführt. Aus diesen Abbildungen geht die Größe der TiO_2 Strukturen von $60 \times 60 \mu\text{m}$ und eine Höhe von 11 nm hervor.

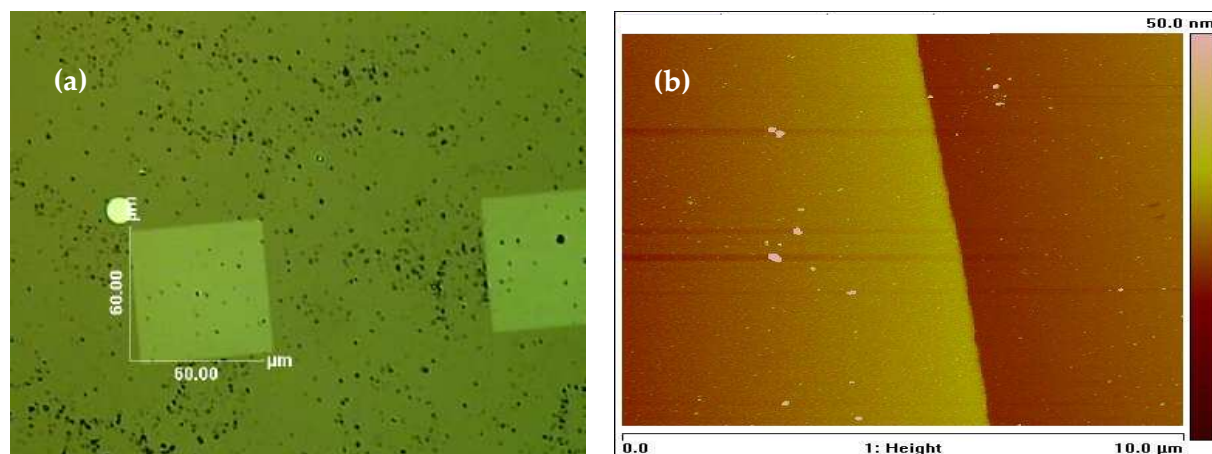


Abbildung 5-2: (a) Mikroskopbild eines ungereinigten strukturierten TiO_2/Si -Wafers und (b) AFM-Bild eines gereinigten strukturierten TiO_2/Si -Wafers; Scanfläche: $10 \times 10 \mu\text{m}$

5.3 Self-Assembly-Monoschichten (SAMs)

Dieses Kapitel befasst sich mit der Ausbildung und Charakterisierung von Monoschichten unterschiedlicher Monoalkylphosphorsäure- und Alkylphosphonsäurederivate. Dazu wurden die erfolgreich synthetisierten SA-fähigen Moleküle (Kapitel 3) aus wässrigen Lösungen auf Titandioxid- und Aluminiumoxidoberflächen adsorbiert und die Schichtbildung eingehend charakterisiert. Als Referenzsubstanz diente die sehr gut untersuchte Verbindung Octadecylphosphonsäure (OPA), die aufgrund ihrer Struktur das Idealbild eines SA-fähigen Moleküls darstellt. Demzufolge besitzen die resultierenden Schichten ein Höchstmaß an möglicher Ordnung und Homogenität und sind somit für einen Vergleich hinsichtlich der Messergebnisse der anderen Verbindungen bestens geeignet.

Der Schwerpunkt der fortführenden Untersuchungen lag auf der detaillierten Charakterisierung der Verbindungen **COOH-EG₃-C₁₇-PO₄H₂**, **COOH-EG₃-C₁₇-PO₃H₂**, **NH₂-EG₃-C₁₇-PO₃H₂** und **COOH-C₁₇-PO₃H₂**, aufgrund der Ausbildung stabiler, dichtgepackter Monoschichten. Diese bildeten eine hervorragende Grundlage für Proteinresistenztests, Anbindungen spezieller Proteine durch eine gezielte Aktivierung der Schicht sowie Oberflächenreaktionen zur terminalen Anbindung höher wertigerer Oligo(ethylenglykole) an die Monoschicht.

5.3.1 Adsorption der Monoalkylphosphorsäure- und Alkylphosphonsäurederivate

Es wurden unterschiedliche SAMs, wie in Kapitel 4.3.2 detailliert beschrieben, auf mit TiO₂ besputterte SiO₂-Wafer hergestellt. Alle Schichten konnten mit der dynamischen Kontaktwinkelmessung, der Mikrotropfenanalyse, der Spektroskopischen Ellipsometrie sowie der winkelabhängigen XPS vollständig untersucht werden. Die Kinetik der Schichtbildung wurde mit der SPR-Spektroskopie sowie der in-situ-Ellipsometrie verfolgt. Als Referenz diente die Verbindung **OPA** [49, 51, 72, 73].

5.3.1.1 Bestimmung der Kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC)

Um die bestmögliche Oberflächenbelegung der Substrate mit SA-fähigen Molekülen zu erzielen, war es zunächst erforderlich, die optimale Konzentration der Adsorptionslösungen zu ermitteln. Dazu wurde das Löslichkeitsverhalten in Abhängigkeit von der Konzentration in Wasser exemplarisch für die Verbindung **COOH-EG₃-C₁₁-PO₃H₂** untersucht.

I. Mäge [13] untersuchte das Löslichkeitsverhalten verschiedener Alkylphosphonsäureester in Wasser. Die Ergebnisse zeigten eine Abhängigkeit der Mizellbildungskonzentration von der Länge der Alkylkette. Für die Verbindung **OPA** wurde eine CMC von $5,5 \cdot 10^{-5}$ mol/l bei 55°C in Wasser ermittelt, während die CMC für die entsprechende Dodecylphosphonsäure bei $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l (in Wasser; 55°C) lag. Das bedeutet, dass mit wachsender Alkylkette die CMC sowie die Wasserlöslichkeit abnahmen.

Die CMC der Verbindung **COOH-EG₃-C₁₁-PO₃H₂** betrug $1,2 \cdot 10^{-2}$ mol/l (bei 20°C in Wasser). Dieser hohe Wert ist durch die polaren funktionellen Gruppen und durch das Ethylenglykol-

Segment bedingt. Außerdem konnten keine echten Mizellen nachgewiesen werden, so dass die drei Verbindungen nicht unmittelbar miteinander vergleichbar sind.

Der Platzbedarf der Phosphonsäuregruppe beträgt etwa 25\AA^2 . Für eine vollständige Oberflächenbelegung sollte die Konzentration mindestens $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l betragen [13]. Aus Sicherheitsgründen wurde deshalb die Konzentration der Adsorptionslösung von 10^{-3} mol/l gewählt. Im Fall für die Verbindung **COOH-EG₃-C₁₁-PO₃H₂** liegt dieser Wert unterhalb der CMC.

5.3.1.2 Ergebnisse der Kontaktwinkelmessung

Die Kontaktwinkelmessung ist eine oberflächensensitive, makroskopische Charakterisierungsmethode, mit deren Hilfe das Benetzungsverhalten von Substratoberflächen beurteilt werden konnte. Es handelte sich dabei um eine einfache, schnell durchführbare und sehr empfindliche analytische Methode zur Charakterisierung von planaren Oberflächen. Aussagen über die Qualität der gebildeten Oberflächenschichten konnten über die Ermittlung von Fortschreit- (θ_A) und Rückzugswinkeln (θ_R), die aus der dynamischen Kontaktwinkelmessung hervorgehen, getroffen werden (Kapitel 4.4.1.1). Für Monoschichten wurden aus den Messwerten Kontaktwinkelhysteresen berechnet ($\theta_A - \theta_R$). Eine Kontaktwinkelhysterese ist ein Maß für die Ordnung der Schicht, Oberflächenrauigkeit, Heterogenitäten in der Schicht sowie Adsorptions- und Desorptionsprozesse während der Messung. Ist die Hysterese klein, d.h. liegt der Wert unterhalb 20° , so handelt es sich um eine physikalisch als auch chemisch homogene Oberfläche. Nimmt die Hysterese weitaus höhere Werte an, so liegen chemisch und physikalisch heterogene Oberflächen vor. Hysteresewerte bezeichnen ebenfalls die Ausbildung von Domänen (Inseln) auf der Substratoberfläche, was eine Barriere für die Bewegung des Wassertropfens entlang der Oberfläche darstellt.

Die gereinigten unadsorbierten TiO₂-Substrate zeigten ein äußerst hydrophiles Verhalten. Die statischen Kontaktwinkelwerte erreichten dabei Größenordnungen von $< 10^\circ$, welche nur ungenau bestimmt werden konnten, da sich diese Werte außerhalb der Nachweisgrenze des Messgerätes bewegten. Bei den im Folgenden präsentierten Ergebnissen handelt es sich um Mittelwerte, die auf der Durchführung von mindestens einer Dreifachbestimmung beruhen.

ie Orientierung und Anordnung der Molekülketten auf einer metalloxidischen Oberfläche ist ein dynamischer Prozess, der eine bestimmte Zeit benötigt, um die Ausbildung einer möglichst dicht gepackten Schicht zu erzielen. Deshalb war es zunächst notwendig, die optimale Adsorptionszeit zu ermitteln. Außerdem wurde die Abhängigkeit der Packungsdichte von der Art des Lösungsmittels der Adsorptionslösung untersucht. Dazu wurden Ethanol und Wasser, zwei geeignete, polare Lösungsmittel gewählt. Es wurden dynamische Kontaktwinkelmessungen nach 1h, 4h, 16h und 64h durchgeführt, um anhand der Kontaktwinkel- als auch Hysteresewerte die optimale Adsorptionsdauer exemplarisch für die Verbindung **COOH-EG₃-C₁₁-PO₄H₂** zu bestimmen (Vergleich auch mit Ellipsometrieergebnissen, Kapitel 5.3.1.4).

Aus den Abbildungen 5-3 und 5-4 geht hervor, dass nach einer Adsorptionszeit von 16h stabile Kontaktwinkelwerte erreicht wurden und im Vergleich zu den kürzeren Zeiten der Hysteresewert am kleinsten war, was für einen höheren Grad der Orientierung und Homogenität der Schichten spricht. Somit benötigten die dargestellten bifunktionalen Moleküle eine relativ lange Adsorptionszeit, um dicht gepackte Schichten auf TiO₂-Substratoberflächen auszubilden. Der Grund dafür kann zum Einen an den zwei funktionellen Endgruppen liegen, die während des Adsorptionsprozesses miteinander konkurrierten und zum Anderen an dem hoch flexiblen Tri(ethylenglykol)-Anteil, der zunächst eine dichte Anordnung der Moleküle vor allem der kurzkettigen Spezies beeinträchtigte. Bei den langkettigen Verbindungen überwogen die Van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen den Alkylketten, das zu einer Ausbildung dicht gepackter Monoschichten führte (siehe Abbildung 5-5 sowie Kapitel 5.3.1.4).

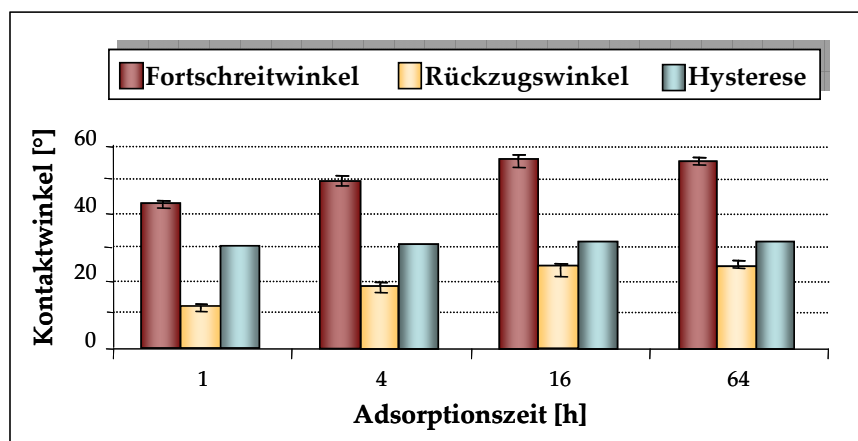


Abbildung 5-3: Graphische Darstellung der dynamischen Kontaktwinkel- und Hysteresewerte in Abhängigkeit von der Adsorptionszeit für die Adsorption der Verbindung **COOH-EG₃-C₁₁-PO₄H₂** aus Ethanol

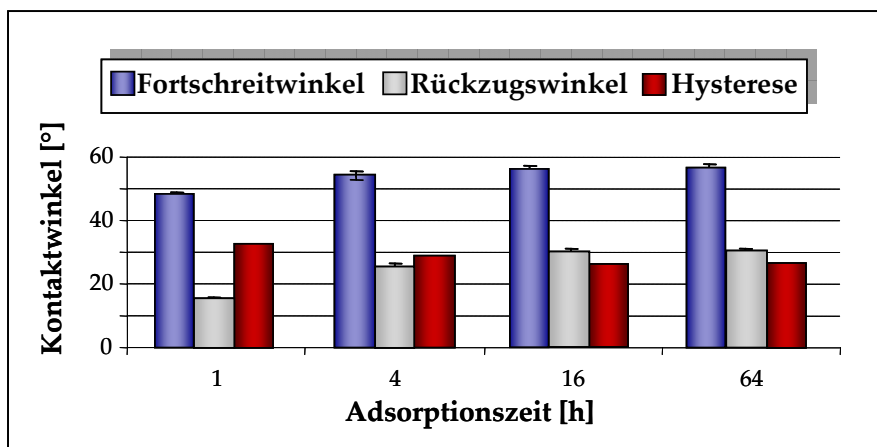


Abbildung 5-4: Graphische Darstellung der dynamischen Kontaktwinkel- und Hysteresewerte in Abhängigkeit von der Adsorptionszeit für die Adsorption der Verbindung **COOH-EG₃-C₁₁-PO₄H₂** aus Wasser

Aus der Adsorptionskinetik der Monoalkylphosphorsäure- bzw. Alkylphosphonsäure-derivate, d. h. aus den ansteigenden Kontaktwinkeln und abnehmenden Hysteresewerten mit zunehmender Adsorptionsdauer ging die Vermutung hervor, dass sich während der kürzeren Adsorptionszeiten die Moleküle zunächst in Form von kleinen Inseln, sogenannten Domänen anordneten. *Schwartz et al.* [148] fanden mit Hilfe von AFM- sowie FTIR-Untersuchungen heraus, dass **OPA** diese Stadien während des Anordnungsprozesses auf metalloxidischen Oberflächen durchlief bis sie letztendlich eine vollständige Schicht ausbildete. Im Rahmen dieser Arbeit wurden diesbezüglich keine Untersuchungen durchgeführt, da nur das Ziel, vollständig bedeckte Oberflächen herzustellen, verfolgt wurde. Des Weiteren ließen sich beim Vergleich der Adsorption aus Ethanol und der Adsorption aus Wasser deutliche Unterschiede bezüglich der Hysteresewerte feststellen. So zeigten die Werte der aus Wasser adsorbierten Schichten eine höhere Homogenität als die ausgebildeten SA-Schichten aus Ethanol. Der Grund dafür lag in der höheren Polarität des Wassers. Es konnten sich zwischen den hydrophilen Einheiten Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden, die zusätzlich durch ihre stabilisierende Wirkung eine bessere Orientierung der Moleküle auf der Oberfläche ermöglichten. Demzufolge wurden für alle weiterführenden Untersuchungen zur Erzeugung von Monoschichten eine Adsorptionsdauer von 16h sowie das Lösungsmittel Wasser bzw. für die schwererlöslichen, langkettigen Verbindungen Ethanol/Wasser im Verhältnis 1:1 gewählt.

Nach einer erfolgreichen Adsorption zeigte die Referenzverbindung **OPA** hydrophobe Eigenschaften (Abbildung 5-5). Im Vergleich dazu wiesen die tri(ethylenglykol)haltigen

Spezies ein hydrophileres Verhalten, bedingt durch den hydrophilen Tri(ethylenglykol)-Anteil im Molekül, auf. Unter diesen Verbindungen war außerdem der Trend zu beobachten, dass die C₁₁-Spezies deutlich kleinere Kontaktwinkelwerte zeigten als die C₁₇-Verbindungen. Der Grund dafür stellte die zunehmende Kettenlänge des Spacers dar, die gleichzeitig den hydrophoben Anteil im Molekül und somit die Van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen den Alkylketten erhöhte. Durch die Verlängerung des Spacers konnte die Packungsdichte der Moleküle auf der Substratoberfläche erhöht werden (siehe auch Kapitel 5.3.1.4). Die generell kleinen Hysteresewerte der C₁₇-Spezies deuteten auf homogene, geordnete Schichten hin. Die kurzkettingen Verbindungen wiesen größere Hysteresewerte auf, was für ungeordnete, nicht dichte SA-Schichten spricht. Daraus kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Länge der Alkylkette maßgeblich die Orientierung der Moleküle auf der Oberfläche beeinflusst.

Die SA-Schichten der Verbindung **COOH-C₁₇-PO₃H₂** zeigten im Vergleich zu den ethylenglykolhaltigen Spezies ein hydrophoberes, aber aufgrund der Endgruppenfunktionalisierung ein hydrophileres Verhalten als **OPA** (Abbildung 5-5).

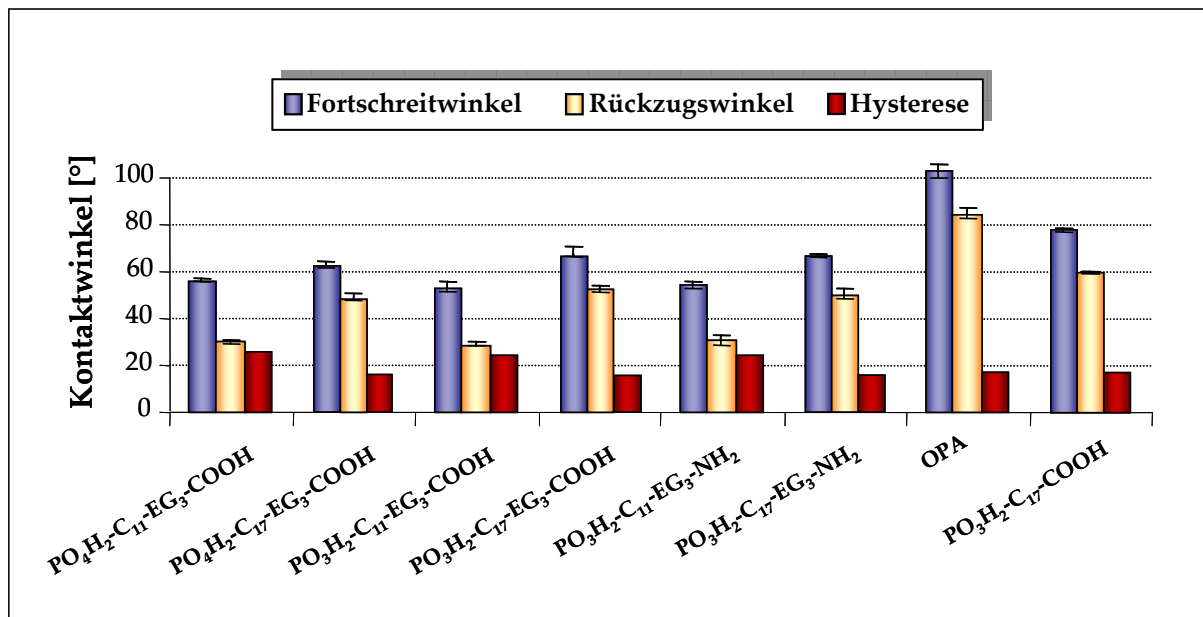


Abbildung 5-5: Graphische Darstellung der dynamischen Kontaktwinkelwerte und der daraus resultierenden Hysteresewerte verschiedener SA-Moleküle auf TiO₂-Substraten.

Dynamische Kontaktwinkelmessungen wurden auch nach der Durchführung der Oberflächenreaktionen, d.h. der Ankopplung von Hexa(ethylenglykol) sowie Polyglycidol

an einer bereits hergestellten SA-Schicht der Verbindung **COOH-C₁₇-PO₃H₂** vorgenommen (Tabelle 5-3).

Tabelle 5-3: Fortschritt- und Rückzugswinkel, Kontaktwinkelhysterese unterschiedlicher Monoschichten auf mit TiO₂ besputterten SiO₂ Wafern

Verbindung	Funktionelle Gruppe	Substrat	Wasser-Kontaktwinkel θ		
			Fortschreit- winkel [°]	Rückzugs- winkel [°]	Hysterese [°]
COOH-EG₃-C₁₁-PO₄H₂	-COOH	SiO ₂ /TiO ₂	56,2±0,8	29,9±1,3	26,3
COOH-EG₃-C₁₇-PO₄H₂	-COOH	SiO ₂ /TiO ₂	62,6±1,6	48,2±2,2	14,4
COOH-EG₃-C₁₁-PO₃H₂	-COOH	SiO ₂ /TiO ₂	53,6±2,2	29,3±1,5	24,3
COOH-EG₃-C₁₇-PO₃H₂	-COOH	SiO ₂ /TiO ₂	65,8±2,0	52,7±1,7	13,1
NH₂-EG₃-C₁₁-PO₃H₂	-NH ₂	SiO ₂ /TiO ₂	55,7±1,7	30,8±2,7	24,9
NH₂-EG₃-C₁₇-PO₃H₂	-NH ₂	SiO ₂ /TiO ₂	66,9±0,8	54,1±2,0	12,8
OPA	-CH ₃	SiO ₂ /TiO ₂	102,7±2,5	85,0±2,4	17,7
COOH-C₁₇-PO₃H₂	-COOH	SiO ₂ /TiO ₂	78,1±0,9	60,3±1,5	17,8
EG₆-COO-C₁₇-PO₃H₂	-OH	SiO ₂ /TiO ₂	51,1±0,5	38,9±1,2	12,2
HPG-COO-C₁₇-PO₃H₂	-OH	SiO ₂ /TiO ₂	29,8±1,2	26,1±1,5	3,7

Anhand der Kontaktwinkelwerte der in Tabelle 5-3 hervorgehobenen Verbindungen, war sehr gut eine zunehmende Hydrophilie mit steigender Kettenlänge der Ethylenglykol-Einheit zu beobachten, was auch gleichzeitig eine erfolgreiche Anbindung des Hexa(ethylenglykols) sowie des Polyglycidols an die Monoschicht der Verbindung **COOH-C₁₇-PO₃H₂** implizierte (siehe auch Kapitel 5.5.1.3). Die Kontaktwinkelhysteresen lagen alle unterhalb 20°, was auf eine physikalisch als auch chemisch homogene Oberfläche hindeutete.

Oberflächenenergien

Mit Hilfe der Oberflächenenergie können Aussagen zur Zusammensetzung sowie Homogenität und Reaktivität der Oberfläche getroffen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden von den in Tabelle 5-4 aufgeführten Verbindungen die Oberflächenenergien nach

OWENS, WENDT, RABEL und KAEUBLE bestimmt (detaillierte Versuchsbeschreibung siehe Kapitel 4.4.1.3). Die folgende Tabelle stellt eine Zusammenfassung dieser Werte dar.

Tabelle 5-4: Statische Kontaktwinkel und die daraus berechneten Oberflächenenergien unterschiedlicher Monoschichten auf mit TiO₂ besputterten SiO₂-Wafers

Verbindung	Kontaktwinkel θ			Oberflächen- energie [mN/m]	Disperser Anteil	Polarer Anteil
	Wasser [°]	Glycerol [°]	Diiod- methan [°]			
reines TiO ₂ -Substrat	10,0±1,2	12,9±0,9	6,1±1,1	73,8	44,6	29,2
COOH-EG ₃ -C ₁₁ -PO ₄ H ₂	56,2±0,8	61,0±0,5	36,8±1,5	47,8	34,5	13,4
COOH-EG ₃ -C ₁₇ -PO ₄ H ₂	62,6±1,6	65,8±1,3	42,2±1,7	43,3	32,5	10,8
COOH-EG ₃ -C ₁₁ -PO ₃ H ₂	53,6±1,2	59,7±1,5	31,4±1,4	50,1	36,1	13,9
COOH-EG ₃ -C ₁₇ -PO ₃ H ₂	65,8±1,0	64,9±1,1	39,0±1,3	44,5	33,8	10,6
NH ₂ -EG ₃ -C ₁₁ -PO ₃ H ₂	55,7±1,7	60,8±1,7	39,5±0,6	49,2	36,5	12,6
NH ₂ -EG ₃ -C ₁₇ -PO ₃ H ₂	66,9±0,8	63,8±1,3	37,5±1,8	43,6	35,1	8,5
OPA	102,7±1,5	97,4±0,7	73,7±1,4	22,7	22,6	0,1

Die gereinigten unmodifizierten TiO₂-Substrate zeigten sehr kleine statische Kontaktwinkel und demzufolge ein sehr hydrophiles Verhalten. Die Oberflächenenergien dieser Substrate lagen im Vergleich zu den mit **OPA** beschichteten Substraten sehr hoch. Da Systeme mit hohen Oberflächenenergien thermodynamisch instabil und demzufolge bestrebt sind, diese zu minimieren, zeigt der berechnete Wert eine äußerst reaktive Oberfläche an, die leicht mit Materialien geringerer Oberflächenenergie bedeckt werden kann. Die Referenzsubstanz **OPA** erzeugte eine sehr unpolare, hydrophobe und homogene Schicht, was sich in einem sehr kleinen Oberflächenenergiewert sowie einem polaren Anteil, der annähernd bei Null lag, äußerte. Allgemein konnte beobachtet werden, dass mit steigender Oberflächenhydrophilie die Oberflächenenergie größer wurde. So zeigten, die auf TiO₂ immobilisierten tri(ethylenglykol)haltigen Alkylphosphonsäure- und Monoalkylphosphorsäurederivate Oberflächenenergien, die zwischen denen der oben beschriebenen Werte lagen. Dabei wiesen die C₁₁-Spezies höhere Werte als die C₁₇-Spezies auf. Auch der polare Anteil der C₁₁-Verbindungen lag aufgrund der kürzeren Alkylkette höher als der der langkettigen


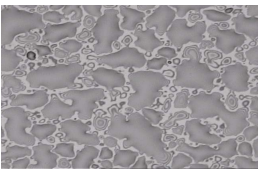
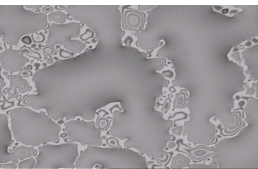
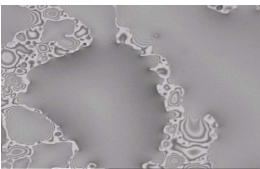

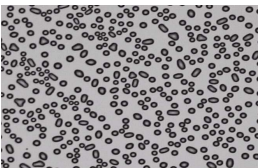
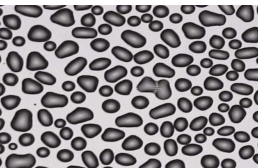
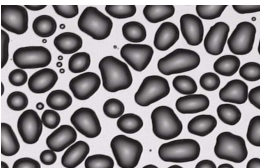

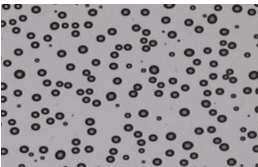
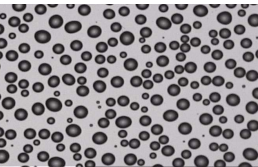
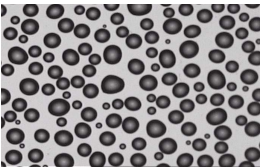

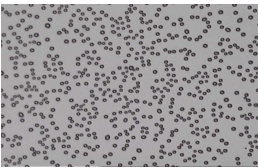
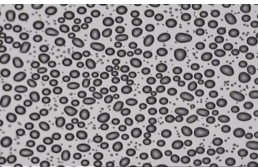
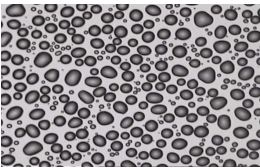
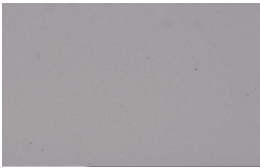
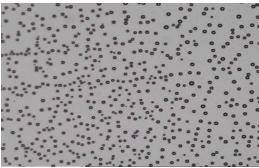
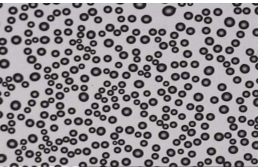
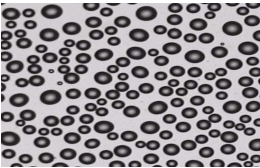
Verbindungen. Das lässt den Schluss zu, dass mit zunehmender Oberflächenenergie die Heterogenität und Reaktivität der SA-Schicht steigt und somit die Oberflächenbedeckung abnimmt.

5.3.1.3 Ergebnisse der Mikrotropfenanalyse

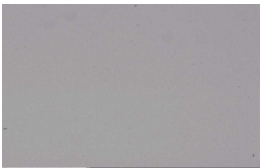
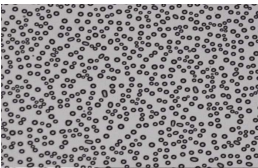
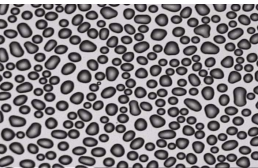
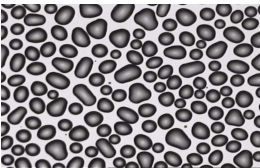

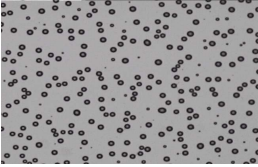
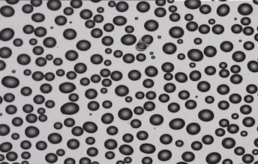
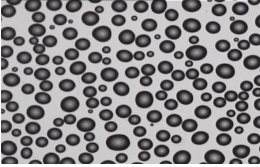

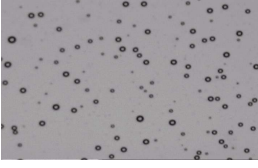

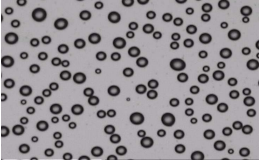
Die Mikrotropfenanalyse ist eine schnell durchführbare, oberflächensensitive analytische Methode, die das Bindeglied zwischen makroskopischen und mikroskopischen Methoden darstellt. Die Auswertung der erhaltenen Kondensationsbilder ermöglicht Aussagen über die makroskopischen sowie mikroskopischen Heterogenitäten anhand der Verteilung der Tropfen auf der Probenoberfläche. Mit Hilfe der Mikrotropfenanalyse wurden die SA-Schichten der Verbindungen **COOH-EG₃-C_{11/17}-PO₄H₂**, **COOH-EG₃-C_{11/17}-PO₃H₂**, **NH₂-EG₃-C_{11/17}-PO₃H₂** und **OPA** auf TiO₂-Substraten charakterisiert. Die Beurteilung der Homogenität der jeweiligen adsorbierten Schichten erfolgte durch den Vergleich der Mikrotropfenbilder und -dichte mit dem reinen TiO₂-Substrat sowie der Referenzsubstanz **OPA**. Die Vorbehandlung der Substrate sowie die Adsorptionsversuche wurden, wie in Kapitel 4.3.1.2 bzw. 4.3.2 detailliert beschrieben, durchgeführt. Die Adsorptionszeit betrug 16h. Die Messungen erfolgten direkt nach der erfolgreichen Anbindung der Moleküle auf der Oberfläche. Es wurden Dreifach-Bestimmungen durchgeführt.

Die erhaltenen Serien von Mikrotropfenbildern für die oben genannten Verbindungen wurden in Tabelle 5-5 dargestellt. Sie zeigen deutlich, dass für alle erzeugten Schichten relativ homogene Oberflächen erhalten wurden. Insbesondere die Verbindung **OPA** wies die für dicht gepackte und homogen ausgebildete SAMs charakteristische sehr geringe Mikrotropfendichte auf. Die adsorbierten Schichten der übrigen Substanzen bildeten in Anbetracht der geringen Substratrauigkeit mit Mikrotropfendichten von etwa 1000 bis 2800 sehr homogene bis schwach inhomogene Oberflächen aus. Zu beobachten war auch, dass für die langkettigen Verbindungen die Mikrotropfendichte wesentlich geringer war und sie somit homogenere Schichten ausbildeten als die C₁₁-Spezies. Diese Abhängigkeit der Homogenität der erhaltenen Schichten von der Kettenlänge des eingesetzten Alkylspacers korreliert sehr gut mit der Theorie der SA-Schichten [25].

Tabelle 5-5: Mikrotropfenbilder auf reinem TiO₂-Substrat und von SA-Schichten der synthetisierten Verbindungen auf TiO₂

SA-Schicht der Verbindung	Substrat	0s	190s	330s	480s	$\mu\text{DD}_{\text{max}}$ [1/mm ²]	Bemerkung
-	TiO ₂					-	Filmbildung
COOH-EG ₃ -C ₁₁ -PO ₄ H ₂	TiO ₂					2070	-
COOH-EG ₃ -C ₁₇ -PO ₄ H ₂	TiO ₂					1120	-
COOH-EG ₃ -C ₁₁ -PO ₃ H ₂	TiO ₂					2400	-
COOH-EG ₃ -C ₁₇ -PO ₃ H ₂	TiO ₂					1400	-

Fortsetzung Tabelle 5-5: Mikrotropfenbilder auf reinem TiO₂-Substrat und von SA-Schichten der synthetisierten Verbindungen auf TiO₂

SA-Schicht der Verbindung	Substrat	0s	190s	330s	480s	$\mu\text{DD}_{\text{max}}$ [1/mm ²]	Bemerkung
NH ₂ -EG ₃ -C ₁₁ -PO ₃ H ₂	TiO ₂					2820	
NH ₂ -EG ₃ -C ₁₇ -PO ₃ H ₂	TiO ₂					1530	-
OPA	TiO ₂					530	-

Vergleich der Mikrotropfendichte mit Kontaktwinkelwerten und Oberflächenenergie

In Tabelle 5-6 sind die statischen Kontaktwinkelwerte sowie die Mikrotropfendichte der jeweiligen SA-Schichten gegenübergestellt.

Tabelle 5-6: Statische Kontaktwinkel und Mikrotropfendichte der Monoschichten auf mit TiO₂ besputterten SiO₂-Wafers

Verbindung	Kontaktwinkel [°]	Mikrotropfendichte [1/mm ²]
COOH-EG ₃ -C ₁₁ -PO ₄ H ₂	56,2±0,8	2070
COOH-EG ₃ -C ₁₇ -PO ₄ H ₂	62,6±1,6	1120
COOH-EG ₃ -C ₁₁ -PO ₃ H ₂	53,6±1,2	2400
COOH-EG ₃ -C ₁₇ -PO ₃ H ₂	65,8±1,0	1400
NH ₂ -EG ₃ -C ₁₁ -PO ₃ H ₂	55,7±1,7	2820
NH ₂ -EG ₃ -C ₁₇ -PO ₃ H ₂	66,9±0,8	1530
OPA	102,7±1,5	530

Aus den Werten der Kontaktwinkelmessung sowie den Mikrotropfendichten geht eine Abhängigkeit der Werte von der Kettenlänge des Alkylspacers hervor. Demzufolge könnte von einem direkten Zusammenhang zwischen Kontaktwinkel und Mikrotropfendichte ausgegangen werden. Das lässt den Schluss zu, dass mit einem zunehmenden hydrophoben Verhalten der Oberfläche die Mikrotropfendichte sinkt und somit die Homogenität der SA-Schicht zunimmt. Ebenso stehen die Werte der Oberflächenenergie in einem direkten Zusammenhang mit der Mikrotropfendichte. Die kurzkettigen Verbindungen zeigten höhere Oberflächenenergien und auch eine höhere Mikrotropfendichte als die langkettigen Verbindungen. Sehr gut korrelieren die Werte von **OPA** miteinander, sie zeigten im Vergleich zu den tri(ethylenglykol)haltigen Verbindungen die geringste Oberflächenenergie und somit auch die kleinste Mikrotropfendichte.

5.3.1.4 Ergebnisse der Spektroskopischen Ellipsometrie

Mit der ex-situ-Ellipsometrie wurde zunächst, wie auch bei der Kontaktwinkelbestimmung (Kapitel 5.3.1.2) bereits beschrieben, aus zeitabhängigen Messungen der Schichtdicke, die optimale Adsorptionszeit sowie ein geeignetes Lösungsmittel zur Herstellung gut

orientierter, möglichst dicht gepackter Schichten ermittelt. Bei diesen Messungen wurden die „trockenen“ Schichten der in Abbildung 5-6 aufgeführten auf TiO_2 -Substraten immobilisierten Verbindungen bestimmt. Davor war es allerdings erforderlich, die unmodifizierten Substrate zu vermessen, um die Dicke der TiO_2 -Schicht zu ermitteln, die als Grundlage zu einem weiteren Schichtaufbau im Modell und somit zur Charakterisierung der Adsorbatschicht diente.

Als Ergebnis der Messungen wurden die elliptischen Parameter Δ und Ψ erhalten. Da diese Werte mit dem Brechungsindex n , dem Extinktionskoeffizienten k und der Schichtdicke d korrelieren (Gleichung 4-8), war es zunächst notwendig, ein Schichtmodell für die Substrate zu entwickeln, welches die Proben exakt und physikalisch sinnvoll beschrieb. Es wurde eine Funktion gewählt, die die Differenz zwischen Modell und den Messdaten erfasste. Bei der Verwendung einer Cauchy-Schicht gelang es durch die Wahl und Variation freier Parameter (A_n ; B_n und C_n), diese Differenzfunktion möglichst klein zu halten. Das Schichtmodell und die ermittelte Schichtdicke des unmodifizierten Substrates dienten als Ausgangspunkt für weitere sich darauf aufbauende Cauchy-Schichten, die zur Ermittlung der Dicke von Adsorptionsschichten genutzt wurden (siehe auch Protokoll Kapitel 4.4.6.3). Bei den dargestellten Ergebnissen handelt es sich um Mittelwerte, die aus mindestens vier Bestimmungen hervorgehen.

Damit eine erfolgreiche, gut geordnete Anbindung der Substanzen auf metalloxidischen Oberflächen möglich war, musste zunächst ein geeignetes Lösungsmittel gefunden werden. Dazu wurden Adsorptionsversuche aus Ethanol und Wasser durchgeführt. Die ellipsometrisch ermittelten Schichtdicken zeigten zum Beispiel für die Verbindung **COOH-EG₃-C₁₁-PO₄H₂** annähernd dieselben Werte, wobei eine sehr hohe Standardabweichung bei der Adsorption aus Ethanol auffiel (Ethanol: $1,49 \pm 0,64$ nm; Wasser: $1,34 \pm 0,08$ nm). Die starke Standardabweichung deutete auf einen inhomogenen Schichtaufbau hin, sodass sich aus diesem Grund das Lösungsmittel Wasser bzw. in Hinsicht auf die schwerer löslichen C₁₇-Spezies, das Gemisch Ethanol/Wasser (1:1) für weitere Versuche etablierte.

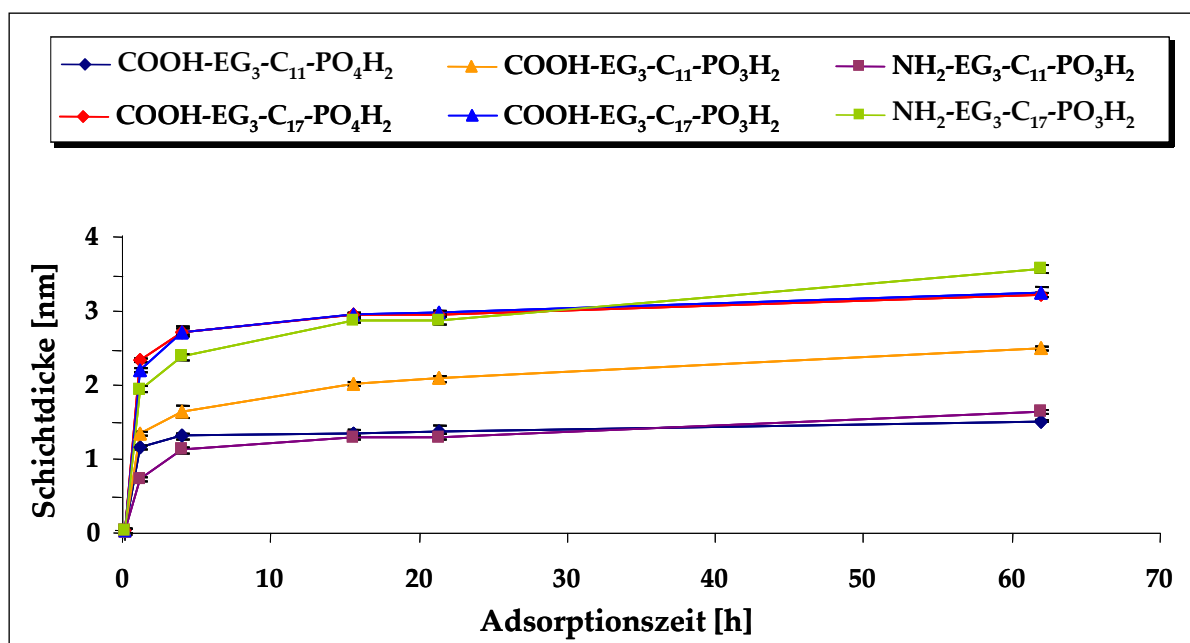


Abbildung 5-6: Graphische Darstellung von Ellipsometrieergebnissen aus zeitabhängigen Adsorptionsversuchen verschiedener Phosphor- und Phosphonsäurederivate auf TiO₂

Aus der Abbildung 5-6 geht hervor, dass für alle aufgeführten Verbindungen die optimale Adsorptionszeit bei 16h lag, was die Schlussfolgerung aus der Kontaktwinkelmessung (siehe Kapitel 5.3.1.2) bestätigte. Die Dicke der Monoschicht stieg bis zu einer Adsorptionszeit von 16h zunächst stark, im Anschluss wesentlich geringer an. Mit fortschreitender Zeit liefen vermutlich neben dem eigentlichen Adsorptionsprozess auch Desorptions- und Umorientierungsvorgänge ab, die letztendlich zu einer gut orientierten, dicht gepackten Monoschicht führten (siehe Kapitel 5.3.1.5 – Ergebnisse der SPR-Spektroskopie). Basierend auf diesen Ergebnissen wurden für die Verbindungen **OPA** und **COOH-C₁₇-PO₃H₂** ebenso eine Adsorptionszeit von 16h als Optimum angenommen.

Bei den ellipsometrischen Untersuchungen konnte neben der Schichtdicke d des Adsorbates auch der Brechungsindex n bei einer Wellenlänge von 630 nm bestimmt werden. Bei der Ermittlung eines geeigneten Modells wurden die Parameter A_n und B_n einer Cauchy-Schicht konstant gesetzt ($A_n = 1,45$; $B_n = 0,01$). Aus dieser Information erfolgte die Berechnung der Oberflächenbedeckung Γ [mg/m²] nach DE FEIJTER:

Gleichung 5-1:

$$\Gamma = d_{as} \frac{(n_{as} - n_L)}{a} ; \quad a = dn/dc$$

Γ : Oberflächenbedeckung; d_{as} : Schichtdicke der adsorbierten Schicht; n_{as} : Brechungsindex der adsorbierten Schicht; n_L : Brechungsindex der Lösung; a : Brechungsindexinkrement

Das Brechungsindexinkrement stellt den linearen Zusammenhang zwischen der Änderung der Konzentration der Lösung und der Änderung des Brechungsindex dn/dc dar. Diese stoffspezifische Größe wurde an der Professur für Spezielle Physikalische Chemie/Physikalische Chemie der Polymere der TU Dresden mit Hilfe des Differentialrefraktometers DR-1 (SLS Systemtechnik Freiburg/Brsg.; Wellenlänge 630 nm) bestimmt. Für die Spezies (COOH-EG₃-C₁₁-PO₄H₂, COOH-EG₃-C₁₁-PO₃H₂, NH₂-EG₃-C₁₁-PO₃H₂) die aus wässriger Lösung adsorbiert wurden, betrug $a=0,205 \text{ cm}^3/\text{g}$. Für die Spezies (COOH-EG₃-C₁₇-PO₄H₂, COOH-EG₃-C₁₇-PO₃H₂, NH₂-EG₃-C₁₇-PO₃H₂, COOH-C₁₇-PO₃H₂, OPA) die aus einem Gemisch aus Ethanol/Wasser adsorbiert wurden, besaß a den Wert von $0,111 \text{ cm}^3/\text{g}$.

Tabelle 5-7: Berechnete Werte für die Oberflächenbedeckung Γ nach DE FEIJTER

Verbindung	$d^a)$ [nm]	$n_{as}^a)$ (25°C)	$n_L^b)$ (25°C)	a [cm ³ /g]	Γ [mg/m ²]
COOH-EG ₃ -C ₁₁ -PO ₄ H ₂	1,34±0,05	1,475	1,333	0,205 (25°C, in H ₂ O)	0,93
COOH-EG ₃ -C ₁₁ -PO ₃ H ₂	1,82±0,03	1,475	1,333	0,205 (25°C, in H ₂ O)	1,26
NH ₂ -EG ₃ -C ₁₁ -PO ₃ H ₂	1,39±0,02	1,475	1,333	0,205 (25°C, in H ₂ O)	0,96
COOH-EG ₃ -C ₁₇ -PO ₄ H ₂	2,95±0,04	1,475	1,358	0,111 (25°C, in H ₂ O/C ₂ H ₅ OH)	3,11
COOH-EG ₃ -C ₁₇ -PO ₃ H ₂	2,97±0,03	1,475	1,358	0,111 (25°C, in H ₂ O/C ₂ H ₅ OH)	3,13
NH ₂ -EG ₃ -C ₁₇ -PO ₃ H ₂	2,89±0,03	1,475	1,358	0,111 (25°C, in H ₂ O/C ₂ H ₅ OH)	3,05
COOH-C ₁₇ -PO ₃ H ₂	3,10±0,02	1,475	1,358	0,111 (25°C, in H ₂ O/C ₂ H ₅ OH)	3,27
OPA	3,42±0,04	1,475	1,358	0,111 (25°C, in H ₂ O/C ₂ H ₅ OH)	3,60

^{a)} ermittelt aus der Cauchy-Schicht für alle adsorbierten Substanzen mit konstanten $A_n=1,45$, $B_n=0,01$, $C_n=0,0$, Wellenlänge: 630 nm; ^{b)} bestimmt mit einem Refraktometer RX-5000, der Fa. ATAGO

Die Oberflächenbedeckung wird hauptsächlich von der reaktiven Kopfgruppe bestimmt, aber auch von der Kettenlänge des Alkylspacers, der Anwesenheit der Ethylenglykoleinheit und der Anwesenheit sowie der Art der terminalen funktionellen Gruppe.

Aus Tabelle 5-7 geht hervor, dass die Moleküle mit der C₁₇-Alkylkette sowie OPA eine höhere Oberflächenbedeckung aufzeigten und somit den geringsten Platzbedarf pro Molekül

haben, als die Verbindungen mit einem kurzen Spacer. Diese Tatsache beruhte auf den stärker wirkenden Van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen den C₁₇-Alkylketten, durch die eine Ausbildung relativ dicht gepackter, gut orientierter Monoschichten auf TiO₂-Oberflächen möglich war. Die kurzkettigen Verbindungen haben auf Grund einer geringeren Oberflächenbedeckung, einen größeren Platzbedarf pro Molekül. Der Grund dafür liegt in den geringeren Van-der-Waals-Wechselwirkungskräften zwischen den Alkylketten und demzufolge in einer geringeren Ordnung der Moleküle innerhalb der Schicht. Die Monoschichten in Abhängigkeit von der Phosphonsäure- zur Phosphorsäuregruppe unterschieden sich qualitativ wenig, ebenso war keine Abhängigkeit zwischen der Carboxyl- und Aminogruppe zu beobachten. Die Anwesenheit der terminalen funktionellen Gruppe sowie der Ethylenglykoleinheit verringerte die Oberflächenbedeckung im Vergleich zu **OPA**, was auf den erhöhten Platzbedarf der Carboxylgruppe sowie der Tri(ethylenglykol)-Ketten zurückzuführen ist. Der Platzbedarf einer Tri(ethylenglykol)-Einheit ist von der Konformation der Kette abhängig, in der helikalen Form beträgt er 21,3 Å², in der all-trans Form 17,1 Å² [149].

Die aus den Ellipsometriemessungen hervorgegangenen Schichtdicken konnten weiterhin mit den theoretischen Kettenlängen der Moleküle verglichen und daraus ebenfalls Informationen über die Qualität der Schicht erhalten werden. Die Berechnung der Molekülgröße erfolgte in der all-trans Konformation. Sie wurde an der Professur für Physikalische Organische Chemie der TU Dresden [150] durchgeführt.

Tabelle 5-8: Gegenüberstellung der experimentell ermittelten Schichtdicken ($d_{(\text{exp.})}$) und der theoretischen Molekülgrößen ($d_{(\text{theor.})}$). Darstellung der berechneten Neigungswinkel β der jeweiligen Moleküle innerhalb der Monoschicht nach *Ulman* [151], [Gleichung 5-2]

Verbindung	$d_{(\text{exp.})}$ [nm]	$d_{(\text{theor.})}$ [nm]	β [°]
COOH-EG ₃ -C ₁₁ -PO ₄ H ₂	1,34±0,05	3,25	66
COOH-EG ₃ -C ₁₇ -PO ₄ H ₂	2,95±0,04	4,13	44
COOH-EG ₃ -C ₁₁ -PO ₃ H ₂	1,82±0,01	3,17	55
COOH-EG ₃ -C ₁₇ -PO ₃ H ₂	2,97±0,03	3,93	41
NH ₂ -EG ₃ -C ₁₁ -PO ₃ H ₂	1,39±0,02	2,79	60
NH ₂ -EG ₃ -C ₁₇ -PO ₃ H ₂	2,89±0,03	3,59	36

Werden die in Tabelle 5-8 angegebenen Größen der berechneten und der experimentell ermittelten Schichtdicken miteinander verglichen, zeigt sich eine stärkere Abweichung für die kurzkettigen Verbindungen und eine geringere für die langkettigen Spezies.

Für diese auftretenden Unterschiede zwischen den beiden Schichtdickenwerten der jeweiligen Verbindungen gibt es folgende Erklärungen:

1. *Die Orientierung der Moleküle in einem bestimmten Winkel zur Oberfläche.*

Simon et al. [152] sowie *G. Busch* [129] berechneten die Neigung adsorbierter Alkylphosphonsäuren auf metalloxidischen Substraten anhand von XPS-Untersuchungen und fand Winkel im Bereich von 30-40° zur Oberflächennormalen. Dieser Neigungswinkel resultierte aus der Anbindung der oberflächenaktiven Kopfgruppe als Mono-, Bi- oder sogar Tridentat an das Substrat. Die Phosphonsäure- bzw. Phosphorsäuregruppe nimmt dabei ein Volumen von 20-30 Å² [13] ein und hat somit einen größeren Platzbedarf als die sich anschließende Alkylkette. Van-der-Waals-Wechselwirkungen wirken nur effektiv, wenn die Alkylketten möglichst eng beieinander liegen und der Spacer mindestens 10 CH₂-Wiederholeinheiten aufweist. Bei einer senkrechten Anordnung der Moleküle auf der Oberfläche würden die Alkylketten weit voneinander entfernt liegen. Um diesen Abstand zwischen den einzelnen Molekülen möglichst klein zu halten und damit die Van-der-Waals-Wechselwirkungen zu erhöhen, ist die Anordnung in einem bestimmten Neigungswinkel zur Oberfläche notwendig [Abbildung 5-7].

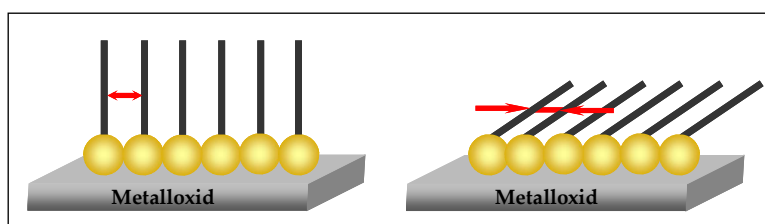


Abbildung 5-7: Schematische Darstellung von SA-Molekülen auf metalloxidischen Oberflächen

Der Neigungswinkel kann nach *Ulman et al.* [151] wie folgt definiert werden:

Gleichung 5-2:

$$\cos\beta = \frac{d_{exp.}}{d_{theor.}}$$

β : Neigungswinkel von der Oberflächennormalen zur Oberfläche; $d_{exp.}$: experimentell ermittelte Schichtdicke; $d_{theor.}$: theoretisch berechnete Molekülgrößen

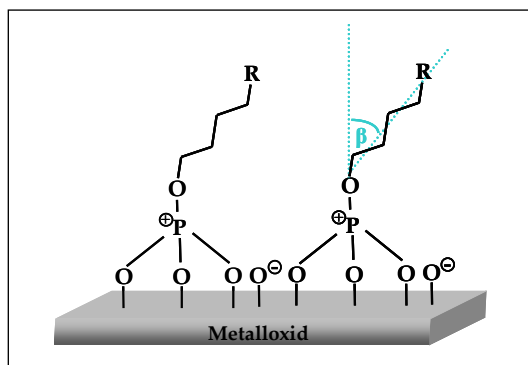


Abbildung 5-8: Schematische Darstellung von adsorbierten Monoalkylphosphorsäurederivaten unter einem bestimmten Neigungswinkel zur Oberflächennormalen nach [151].

Die Neigungswinkel zur Oberflächennormalen gaben bedingt Aufschluss über die Orientierung der Moleküle zur Oberfläche. Bei den kurzkettigen Verbindungen waren große Kippwinkel zu verzeichnen, was auf einen erhöhten Platzbedarf der Moleküle, demzufolge auf einen niedrigen Grad der Orientierung und einer unvollständig bedeckten Oberfläche hindeutete. Aufgrund schwacher Van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen den Alkylketten, bildeten die Moleküle eine lockere Schicht aus. Die langkettigen Spezies wiesen Neigungswinkel zwischen 36 und 44° auf, was den Beobachtungen von *Simon et al.* [152] entsprach und auf eine relativ dicht gepackte Schicht hindeutete.

Da es sich aber bei den Betrachtungen von *Simon et al.* [152] und *G. Busch* [159] um Alkylphosphonsäuren handelt und nicht wie in der vorliegenden Arbeit um Alkylphosphorsäurederivate mit einer terminalen sehr flexiblen Tri(ethylenglykol)-Einheit sind die in Tabelle 5-8 angegebenen Neigungswinkel als „Näherungen“ zu betrachten. In Abhängigkeit von der Konformationen beeinflussen die Tri(ethylenglykol)-Ketten den Kippwinkel der Moleküle zur Oberfläche. Um genauere Aussagen sowie auch Hinweise zur Orientierung der Ethylenglykol-Einheit geben zu können, müssen weitere Meßmethoden, wie zum Beispiel PM-IRRAS, hinzugezogen werden.

2. Konformation der Tri(ethylenglykol)-Einheit

Die flexible Tri(ethylenglykol)-Einheit kann in unterschiedlichen Konformationen auftreten, die einen Einfluss auf die Schichtdicke sowie auf die Proteinresistenz ausüben. Neben der zur Berechnung herangezogenen planaren all-trans Konformation existiert bei immobilisierten Tri(ethylenglykol)-terminierten Alkylthiolen auf Gold eine helikale Struktur, die nach *Harder et al.* [153] effektive proteinresistente Schichten bilden. Im Gegensatz dazu steht die all-trans Konformation, die sich bevorzugt auf Silbersubstraten ausbildet. Diese

Filme adsorbieren nachweislich signifikante Proteinmengen [153]. *Grunze et al.* [154] fand am Beispiel einer Tri(ethylenglykol)-terminierten Alkylthiol-Monoschicht mit Hilfe von IRRAS-Messungen heraus, dass die Ordnung der EG-Einheit von der Polarität des Lösungsmittels und dessen Möglichkeit Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden abhängt. In Luft lag eine relativ gut geordnete Ethylenglykol-terminierte SA-Schicht vor, nach Zugabe von Wasser war durch das Eindringen des Lösungsmittels in die hydrophile EG-Schicht eine ungeordnete, gequollene Struktur zu beobachten (Abbildung 5-09). Da im Rahmen dieser Arbeit die ex-situ-Ellipsometriemessungen der Monoschichten im „trockenen“ Zustand erfolgten, lässt sich aus den Beobachtungen von *Grunze et al.* [154] und anhand der Neigungswinkel die Schlussfolgerung ziehen, dass dicht gepackte EG-Schichten mit annähernd gut geordneten Strukturen, hauptsächlich bei den C₁₇-Spezies, zu vermuten sind. Die Konformation der Tri(ethylenglykol)-Kette innerhalb der Monoschicht konnte experimentell nicht bestimmt werden.

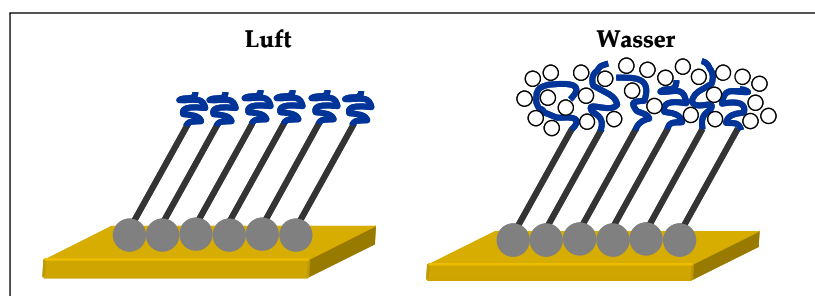


Abbildung 5-9: Schematische Darstellung des Lösungsmittelleffektes auf einer EG-terminierten Alkanthiolschicht nach *Grunze et al.* [154].

5.3.1.5 Ergebnisse der SPR-Spektroskopie und der in-situ-Ellipsometrie

Mit Hilfe der SPR-Spektroskopie konnte die Kinetik der Schichtbildung, der dargestellten SA-Molekülen in-situ untersucht werden. Die zeitabhängigen Messungen erfolgten aus wässrigen Systemen an mit Gold/Al₂O₃ beschichteten LaSFN9 Glassubstraten. Alle Messungen wurden mindestens als Dreifachbestimmungen absolviert. Die im SPR-Sensogramm (Abbildung 5-10) aufgetragene Größe ΔRI umfasste die Änderung der reflektierten Intensität des Laserstrahls vor der Zugabe der Adsorptionslösung und nach dem Spülen der Messzelle mit reinem Lösungsmittel ($\Delta RI = RI_{nach\ Adsorption} - RI_{vor\ Adsorption}$).

Die in Abbildung 5-10 dargestellten Kinetikkurven zeigten den Adsorptionsverlauf von verschiedenen Alkylphosphonsäure- und Monoalkylphosphorsäurederivaten auf Al₂O₃. Die Kinetikmessung begann zunächst mit einer 20 minütigen Equilibrierungsphase, bei der die

Probe gegen das reine Lösungsmittel vermessen wurde. Nach dieser Zeit erfolgte die Zugabe der jeweiligen Adsorptionslösung in die Messzelle. Die Kurven stiegen sofort steil an, was zum Einen durch die Konzentrationsänderung der zugegebenen Lösung mit der Änderung des Brechungsindex und zum Anderen mit einer sofort einsetzenden Anbindung der Moleküle an der Oberfläche begründet werden kann. Im weiteren Kurvenverlauf war ein stetiger Anstieg zu beobachten, der schließlich in einem Plateau endete. Dieses Plateau stellte im Kurvenverlauf ein dynamisches Gleichgewicht dar. Es lagen Adsorptions- und Desorptionsvorgänge gleichzeitig vor, die zusätzlich noch mit Umordnungsprozessen verbunden waren. Da an der gebildeten chemisorbierten Schicht wiederum Moleküle anhaften können, war es notwendig, nach beendeter Adsorption das Substrat gründlich mit Lösungsmittel zu spülen, um diese physisorbierten Moleküle sowie die überschüssige Adsorptionslösung zu entfernen. Im Kurvenverlauf wurde das an einem kurzen steilen Abfall der Kurve nach einer Adsorptionszeit von 16h ersichtlich.

Beim Vergleich der Adsorptionskurven zeigte sich, dass wie erwartet, die Verbindungen mit den kürzeren Alkylketten geringere Schichtdicken ausbildeten als die C₁₇-Spezies. Alle Verbindungen zeigten nach einer Adsorptionszeit von 16h ein Plateau im Kurvenverlauf, was auf eine vollständige Ausbildung der jeweiligen Monoschicht hindeutete. Nach dem gründlichen Spülen am Ende der Adsorption fiel die Kurve nur leicht ab und verlief dann in einem Plateau konstant weiter, was für eine feste Anbindung der Moleküle auf der Oberfläche sprach.

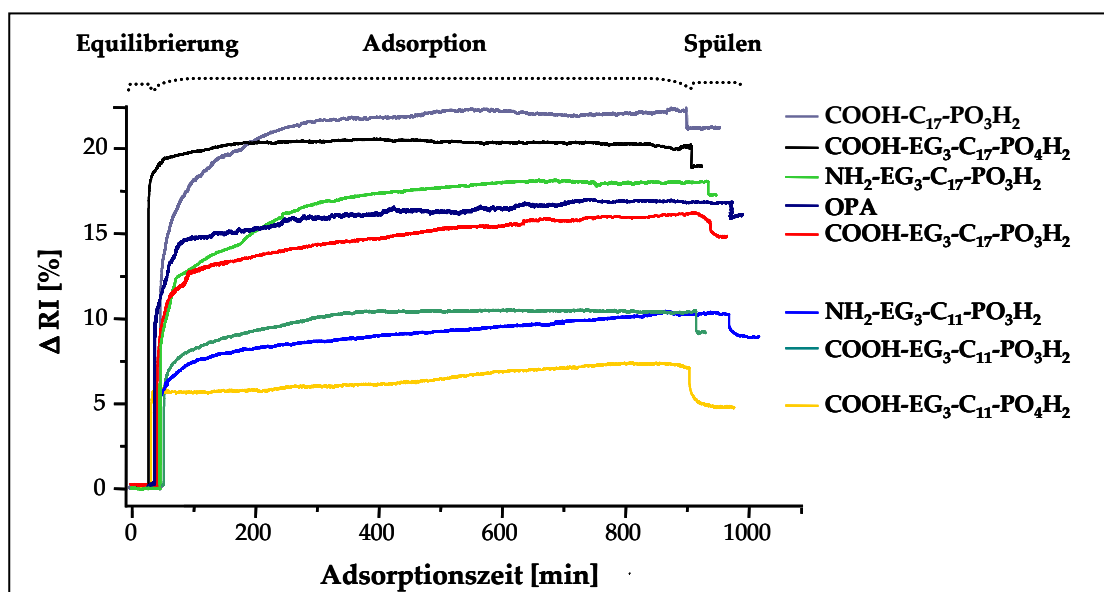


Abbildung 5-10: SPR-Sensogramme zeigten den Adsorptionsverlauf verschiedener Phosphor- und Phosphonsäurederivate auf Gold/Al₂O₃-Substraten.

Einen Beweis für die erfolgreiche Ausbildung einer Adsorbatschicht konnte ebenfalls durch einen Vergleich der Lage der Minima vor und nach der Adsorption erbracht werden, die aus dem winkelabhängigen Messmodus resultierten. Die Winkeldifferenz betrug $1,0^\circ$.

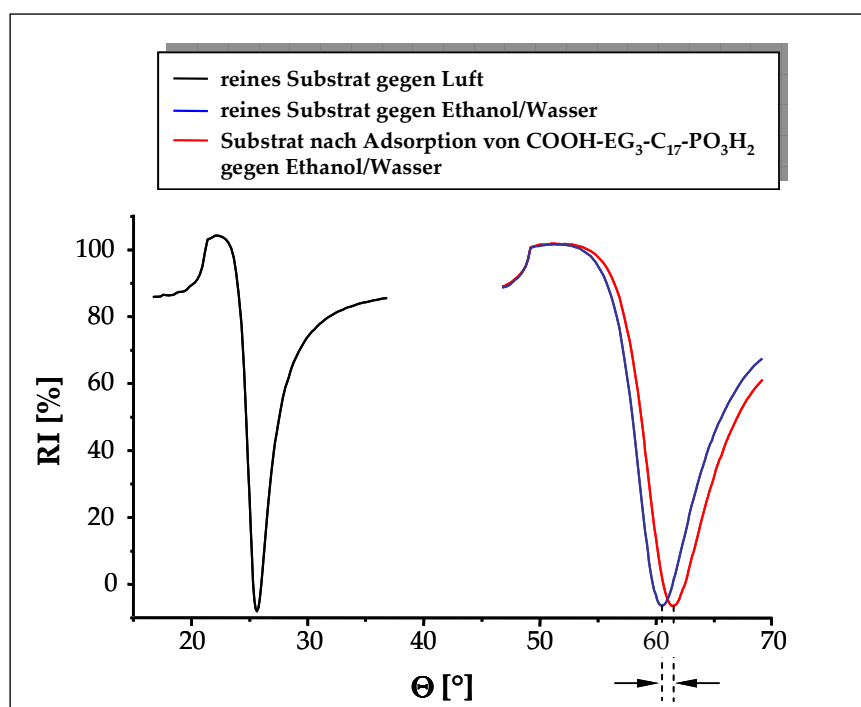


Abbildung 5-11: Graphische Darstellung von winkelabhängigen Messungen vor und nach der Adsorption von $\text{COOH-EG}_3\text{-C}_{17}\text{-PO}_3\text{H}_2$ auf Gold/ Al_2O_3 .

Wenz *et al.* [155] postulierte, dass eine Winkeldifferenz von $0,2^\circ$ einer Schichtdickenänderung von 1 nm bei immobilisierten Alkylthiolaten auf Goldoberflächen entspricht. Daraus würde exemplarisch für die Monoschicht der Verbindung $\text{COOH-EG}_3\text{-C}_{17}\text{-PO}_3\text{H}_2$ eine Dicke von 5,0 nm in wässriger Lösung resultieren. Dieser Wert korreliert sehr gut mit der ermittelten Schichtdicke aus der in-situ-Ellipsometrie-Untersuchung. Bei dieser Methode konnte die Adsorption der Verbindung $\text{COOH-EG}_3\text{-C}_{17}\text{-PO}_3\text{H}_2$ aus wässriger Lösung in-situ beobachtet werden, das heißt die zeitabhängige Änderung der Δ - und Ψ -Werte. Nach einer Adsorptionsdauer von 16h und gründlichem Spülen des TiO_2 -Substrates wurde eine Schichtdicke von 5,05 nm sowie ein Brechungsindex des Adsorbates von $n(630\text{ nm}) = 1,447$ (25°C) in wässriger Lösung ermittelt (Cauchy-Schicht mit $A_n = 1.4306$, $B_n = 0.0065287$, $C_n = 0.0$, Wellenlänge: 630 nm). Nach DE FEIJTER (Gleichung 5-1) konnte eine adsorbierte Menge und damit eine Oberflächenbedeckung von $4,05\text{ mg/m}^2$ berechnet werden. Aufgrund der zur Berechnung der Ellipsometriedaten zugrunde liegenden unterschiedlichen Modellannahmen können die Werte der adsorbierten Menge im wässrigen Milieu nicht mit den Werten des „trockenen“ Adsorbates (siehe Tabelle 5-7; $3,34\text{ mg/m}^2$) verglichen werden.

5.3.1.6 Ergebnisse der XPS-Untersuchung

Zur Charakterisierung der SA-Schichten wurden hochaufgelöste sowie winkelabhängige XPS-Untersuchungen mit allen synthetisierten Verbindungen durchgeführt, um die erfolgreiche Anbindung der Phosphat- bzw. Phosphonatgruppe, die richtige Orientierung der Moleküle auf der Substratoberfläche sowie die Elementzusammensetzung zu ermitteln. Die gezeigten Ergebnisse basieren auf der Durchführung von Doppelbestimmungen. Alle SA-Schichten der untersuchten Monoalkylphosphorsäure- und Alkylphosphonsäureester wurden mit der hochaufgelösten XPS bei einem Detektorwinkel von 45° bestimmt. Während der winkelabhängigen Messungen variierte der Detektorwinkel zwischen 10° und 70° (Winkelwerte relativ zur Substratoberfläche), um eine Variation der Informationstiefe innerhalb der SA-Schicht zu erzielen.

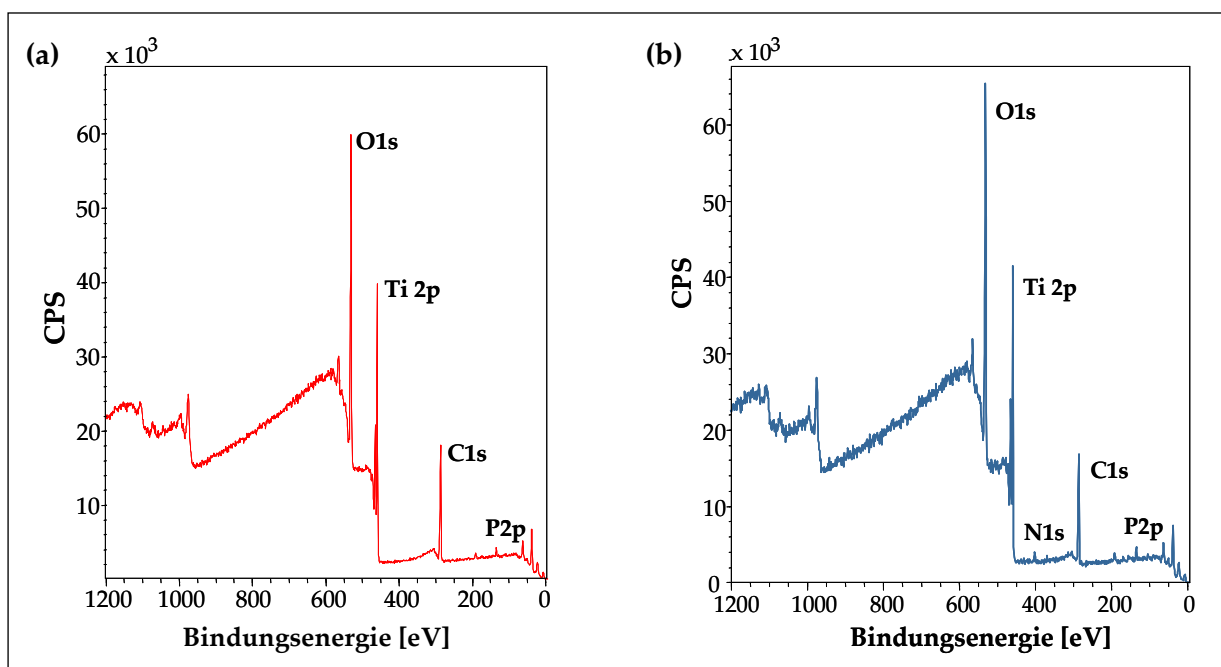


Abbildung 5-12: XPS-Übersichtsspektren von (a) der adsorbierten Verbindung $\text{COOH-EG}_3\text{-C}_{17}\text{-PO}_3\text{H}_2$ und (b) der SA-Schicht von $\text{NH}_2\text{-EG}_3\text{-C}_{17}\text{-PO}_3\text{H}_2$.

Abbildung 5-12 zeigt exemplarisch die beiden Übersichtsspektren der Monoschichten der Verbindungen $\text{COOH-EG}_3\text{-C}_{17}\text{-PO}_3\text{H}_2$ und $\text{NH}_2\text{-EG}_3\text{-C}_{17}\text{-PO}_3\text{H}_2$. Aus ihnen sind die erwarteten Elemente Titan, Kohlenstoff, Sauerstoff, Phosphor sowie Stickstoff ersichtlich. Die Detailspektren für C1s, O1s, P2p, Ti2p und N1s (Abbildung 5-13 und 5-14) wurden in ihre Komponenten zerlegt und liefern die folgenden qualitativen Aussagen zu den jeweiligen

Monoschichten.

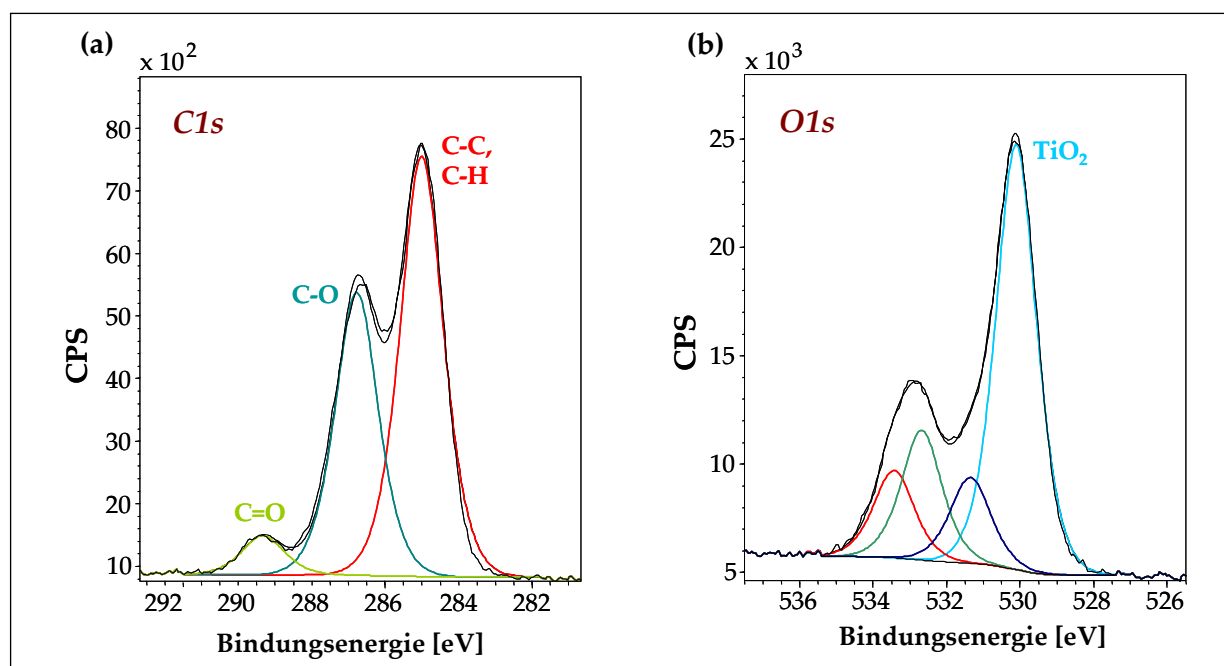


Abbildung 5-13: XPS-Detailspektren (a) C1s-Spektrum und (b) O1s-Spektrum der adsorbierten Verbindung **COOH-EG₃-C₁₇-PO₃H₂**.

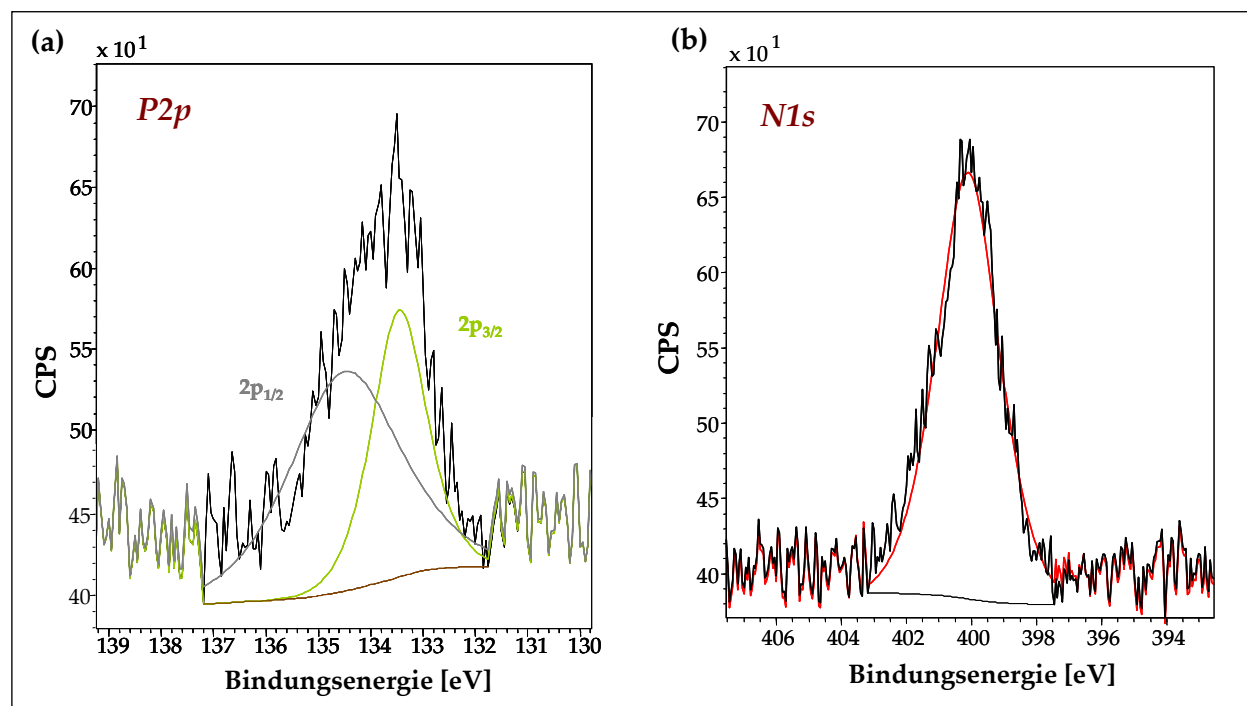


Abbildung 5-14: XPS-Detailspektren (a) P2p-Spektrum und (b) N1s-Spektrum der adsorbierten Verbindung **NH₂-EG₃-C₁₇-PO₃H₂**.

Aus den Detailspektren und den daraus gewonnen Bindungsenergien können Aussagen zu den in der Monoschicht der Verbindung enthaltenen Molekülgruppen und deren Anbindung auf der Substratoberfläche getroffen werden.

P2p: Das Phosphorsignal (Abbildung 5-14 (a)) wurde als ein einfaches Doublet angefitet, mit $P2p_{3/2}$ bei $\sim 134,6 \pm 0,1$ eV und $P2p_{1/2}$ mit einer Bindungsenergie Differenz von 0,81 eV und einem festgelegten Flächenverhältnis von 2:1.

Ti2p: Es konnte nur eine chemische Spezies im Ti2p Signal detektiert werden. Die Bindungsenergie korrelierte dabei mit der für TiO_2 bei 458,6 eV für $Ti2p_{3/2}$.

C1s: Den größten Beitrag im C1s-Signal (Abbildung 5-13 (a)) lieferte der aliphatische Kohlenstoff mit einer Bindungsenergie von 285 eV. Die Schulter bei der Bindungsenergie von $\sim 286,7$ eV konnte mit der Ethergruppe (C-O-C) aus dem Tri(ethylenglykol) und der C-O-P Bindung in Verbindung gebracht werden. Die Bindungsenergie von $\sim 289,3$ eV entsprach den C=O- und CO-O-Bindungen, die aus der Carboxylgruppe hervorgingen. Die in den Amino-Spezies enthaltenen C-N-Bindungen lagen bei einer Bindungsenergie von 288,4 eV.

O1s: Bei einem Detektorwinkel von 45° lieferte TiO_2 den größten Beitrag im O1s Signal mit einer Bindungsenergie von 530,1 eV (Abbildung 5-13 (b)). Die Zuordnung weiterer Bindungsenergien war wesentlich schwieriger. Die Unterteilung des O1s Signals erfolgte des weiteren in die Molekülgruppen, die in Verbindung mit der Anbindung des Moleküls an das Substrat standen, sich quasi an der Grenzfläche zum TiO_2 befanden. Die Bindungsenergie von $\sim 531,3$ eV entsprach den Molekülgruppen Ti-O-P, Ti-OH. Bei $\sim 532,6$ eV lagen die Gruppen C-O-P, C-O-C sowie P=O und bei $\sim 533,4$ eV die Molekülgruppe P-OH.

N1s: Das N1s-Signal (Abbildung 5-14 (b)) lag bei einer Bindungsenergie von 400,1 eV und entsprach der terminalen NH_2 -Gruppe in der SA-Schicht der jeweiligen Moleküle.

Quantitative Aussagen über die elementare Zusammensetzung der adsorbierten Verbindungen sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengestellt. Die Atomkonzentrationen der Elemente resultierten aus den Spektren der hochaufgelösten Messungen. Aus den experimentell ermittelten und den theoretischen Werten ließ sich eine sehr gute Übereinstimmung feststellen. Das sprach für eine quantitative Elementzusammensetzung der SA-Schichten auf der Substratoberfläche.

Tabelle 5-9: Vergleich der experimentell ermittelten Elementzusammensetzungen der SA-Schichten auf TiO₂ mit den theoretisch berechneten Werten (in Klammern geschrieben).

Verbindung	C [At%]	O [At%]	P [At%]	N [At%]
COOH-EG ₃ -C ₁₁ -PO ₄ H ₂	61,9 ± 1,7 (63,3)	34,3 ± 1,3 (33,3)	3,3 ± 0,1 (3,3)	-
COOH-EG ₃ -C ₁₇ -PO ₄ H ₂	70,7 ± 0,4 (69,4)	26,4 ± 1,7 (27,8)	2,8 ± 0,1 (2,8)	-
COOH-EG ₃ -C ₁₁ -PO ₃ H ₂	65,6 ± 1,2 (65,5)	32,9 ± 1,1 (31,0)	3,0 ± 0,3 (3,4)	-
COOH-EG ₃ -C ₁₇ -PO ₃ H ₂	70,3 ± 0,9 (71,4)	26,4 ± 1,7 (25,7)	3,2 ± 0,2 (2,9)	-
NH ₂ -EG ₃ -C ₁₁ -PO ₃ H ₂	66,5 ± 1,5 (68,0)	25,6 ± 0,9 (24,0)	4,2 ± 0,4 (4,0)	3,8 ± 0,2 (4,0)
NH ₂ -EG ₃ -C ₁₇ -PO ₃ H ₂	73,1 ± 0,6 (74,2)	20,9 ± 1,5 (19,3)	3,3 ± 0,1 (3,2)	3,0 ± 0,1 (3,2)
COOH-C ₁₇ -PO ₃ H ₂	72,2 ± 1,1 (73,1)	23,5 ± 1,0 (23,1)	3,8 ± 0,2 (3,8)	-

Aussagen zu den in den SA-Schichten der jeweiligen Verbindungen enthaltenen Molekülgruppen und deren Anbindung auf der Substratoberfläche konnten aus den Bindungsenergien getroffen werden. Diese Werte sind in Tabelle 5-10 zusammengestellt.

Tabelle 5-10: XPS Bindungsenergien (± 0.1 eV) dargestellt für die SA-Schichten aller synthetisierten Moleküle, adsorbiert auf TiO₂-Oberflächen, Referenz: C1s-Peak bei 285.0 eV.

Element	Molekülgruppe	Bindungsenergie [eV]						
		COOH- EG ₃ -C ₁₁ - PO ₄ H ₂	COOH- EG ₃ -C ₁₇ - PO ₄ H ₂	COOH- EG ₃ -C ₁₁ - PO ₃ H ₂	COOH- EG ₃ -C ₁₇ - PO ₃ H ₂	NH ₂ - EG ₃ -C ₁₁ - PO ₃ H ₂	NH ₂ - EG ₃ -C ₁₇ - PO ₃ H ₂	COOH- C ₁₇ -PO ₃ H ₂
C1s (1)	CH ₂	285,0	285,0	285,0	285,0	285,0	285,0	285,0
C1s (2)	C-O-P, C-O, C-P	286,8	286,6	286,8	286,7	286,7	286,6	286,7
C1s (3)	C=O, CO-O bzw. C-N	289,3	289,4	289,5	289,5	288,4	288,4	289,1
N1s	NH ₂	-	-	-	-	400,1	400,1	-
O1s (1)	TiO ₂	530,1	530,1	530,1	530,1	530,1	530,1	530,1
O1s (2)	Ti-O-P	531,4	531,5	531,4	531,4	531,3	531,4	531,4
O1s (3)	P-O-C, C-O-C, P=O	532,7	532,7	532,8	532,8	532,4	532,4	532,2
O1s (4)	P-OH	533,4	533,6	533,6	533,5	533,2	533,2	533,3
P2p ^{1/2}		134,8	134,8	134,5	134,3	134,3	134,5	134,5
P2p ^{3/2}	C-(O)-P(=O)(O) ₂	133,9	133,9	133,7	133,5	133,7	133,7	133,7
Ti2p	TiO ₂	459,2	459,3	459,3	459,2	459,2	459,3	459,3

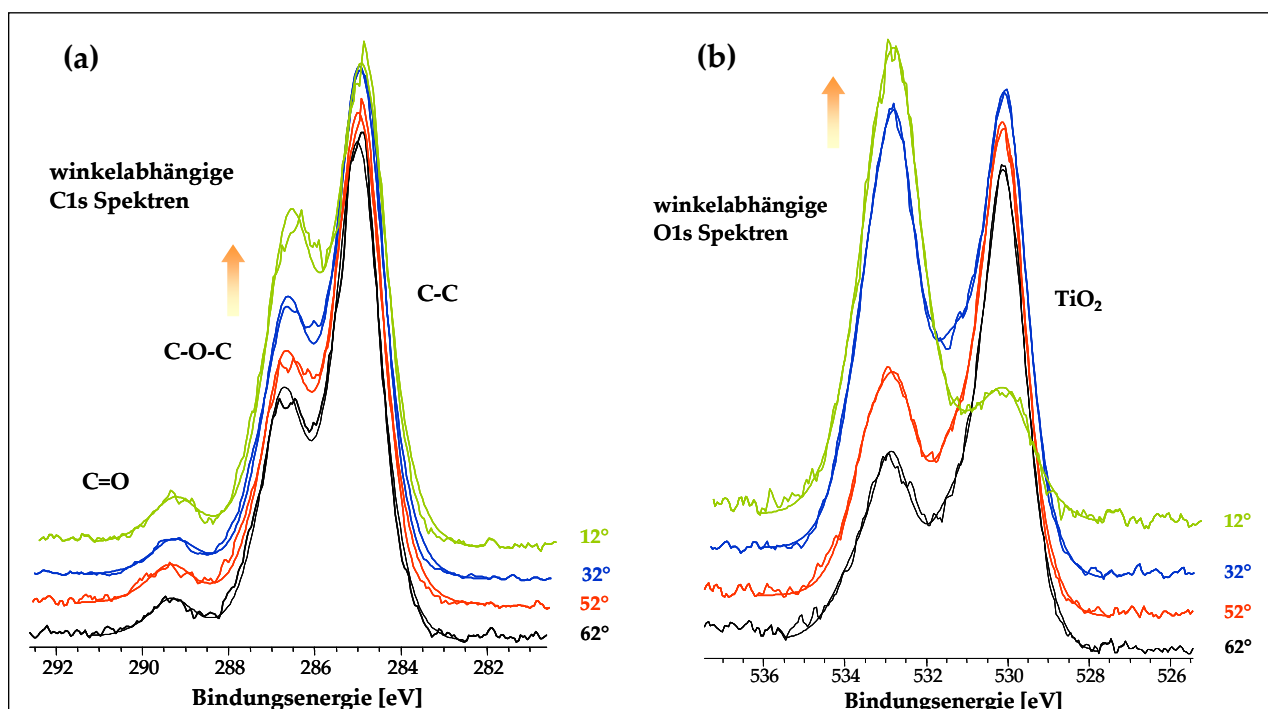


Abbildung 5-15: Winkelabhängige XPS-Detailspektren (a) C1s-Spektrum und (b) O1s-Spektrum der adsorbierten Verbindung $\text{COOH-EG}_3\text{-C}_{17}\text{-PO}_3\text{H}_2$ bei verschiedenen Detektorwinkeln zur Substratoberfläche.

Die winkelabhängigen Detailspektren der Abbildung 5-15 zeigten deutlich die Orientierung der chemisorbierten Monoalkylphosphonsäure- und Alkylphosphorsäuremoleküle auf der Oberfläche, die sich durch eine Veränderung der Intensitäten der Elemente mit variierendem Detektorwinkel äußert. In Abbildung 5-15 (a) und (b) sind jeweils vier C1s- und O1s-Spektren bei einem Detektorwinkel von 12, 32, 52 und 62° zur Substratoberfläche dargestellt. Bei den C1s-Spektren war deutlich eine Intensitätsabnahme des Kohlenstoffsignals innerhalb der C-C-, C-O-C- und C=O-Molekülgruppen mit steigendem Detektorwinkel zur Oberfläche zu beobachten. Eine starke Abnahme der Intensität zeigte das Sauerstoffsignal der Molekülgruppe C-O-C mit zunehmendem Detektorwinkel im O1s Spektrum der Abbildung 5-15 (b), dagegen stieg, wie erwartet, die Intensität des TiO₂ Signals an. Ebenfalls sanken bei allen Verbindungen die Intensitäten des Phosphorsignals mit abnehmendem Detektorwinkel, d. h. mit zunehmender Entfernung zur Oberfläche. Mit Hilfe dieser winkelabhängigen Betrachtungen kann bewiesen werden, dass die synthetisierten SA-Moleküle die richtige Orientierung auf der Oberfläche besaßen. Die Phosphorsäure- bzw. Phosphonsäuregruppen befanden sich an der Grenzfläche zwischen Substrat und Alkylkette und die Carboxyl- bzw. Aminogruppen im Anschluss an den Spacer und der Tri(ethylenglykol)-einheit auf der Monoschicht. Es kann

demzufolge von einer erfolgreichen Adsorption der SA-Moleküle ausgegangen werden. Diese Beobachtungen wurden ebenfalls in den nachfolgenden Auswertungen sichtbar.

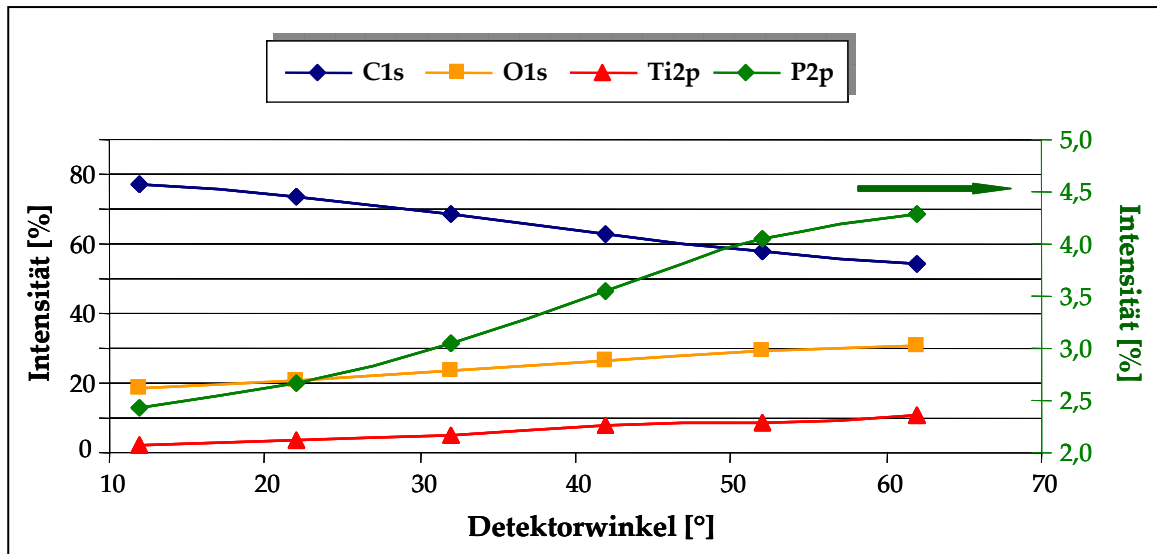


Abbildung 5-16: Darstellung der Intensitätsänderung unterschiedlicher Elemente aus der Monoschicht der Verbindung $\text{COOH-EG}_3\text{-C}_{17}\text{-PO}_3\text{H}_2$ während einer winkelabhängigen Messung.

In Abbildung 5-16 sind exemplarisch für die Monoschicht der Verbindung $\text{COOH-EG}_3\text{-C}_{17}\text{-PO}_3\text{H}_2$ die Veränderungen der Intensitäten der Elemente in Abhängigkeit vom Detektorwinkel dargestellt. Die Abnahme der Kohlenstoffintensität innerhalb der Monoschicht mit zunehmendem Winkel war deutlich zu sehen. Dagegen stiegen die Intensitäten von Sauerstoff aufgrund der stark zunehmenden Intensität von TiO_2 , Titan und Phosphor an, das auf eine erwartete Orientierung des Phosphors im substratnahen Bereich hindeutete.

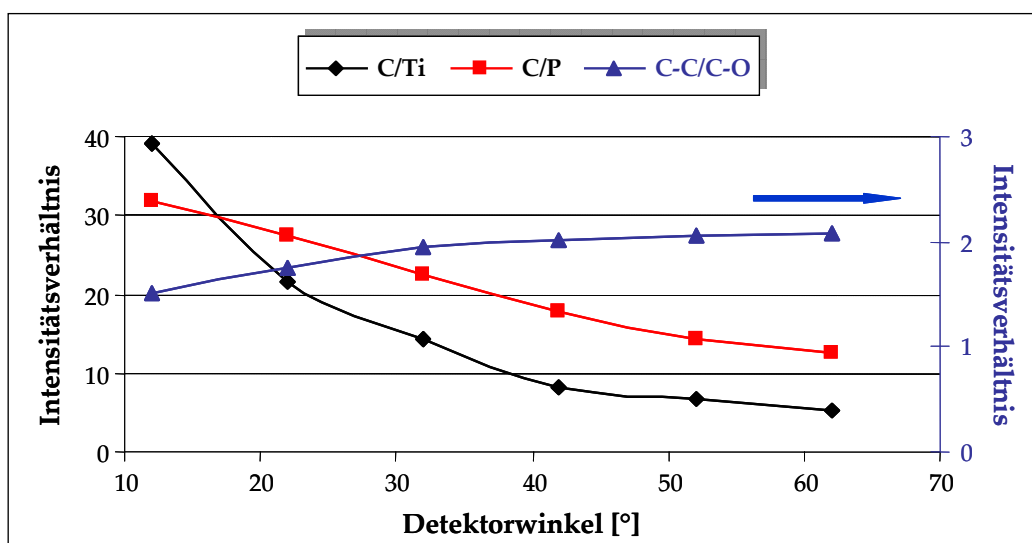


Abbildung 5-17: Darstellung der Änderung der Intensitätsverhältnisse unterschiedlicher Elemente aus der Monoschicht der Verbindung $\text{COOH-EG}_3\text{-C}_{17}\text{-PO}_3\text{H}_2$ während einer winkelabhängigen Messung.

Die Intensitätsverhältnisse der Elementsignale einer **COOH-EG₃-C₁₇-PO₃H₂**-Monoschicht wurden in Abbildung 5-17 bei verschiedenen Detektorwinkeln aufgetragen. An dem Verhältnis C-C/C-O zeigte sich die Orientierung der Alkylketten im substratnahen Bereich und die sich daran anschließende Tri(ethylenglykol)-einheit im oberen Bereich der Monoschicht. Des Weiteren nahmen die Verhältnisse von C/P und C/Ti mit steigendem Winkel zu, was für eine Abnahme der Kohlenstoff- und Zunahme der Phosphor- sowie Titanintensität sprach.

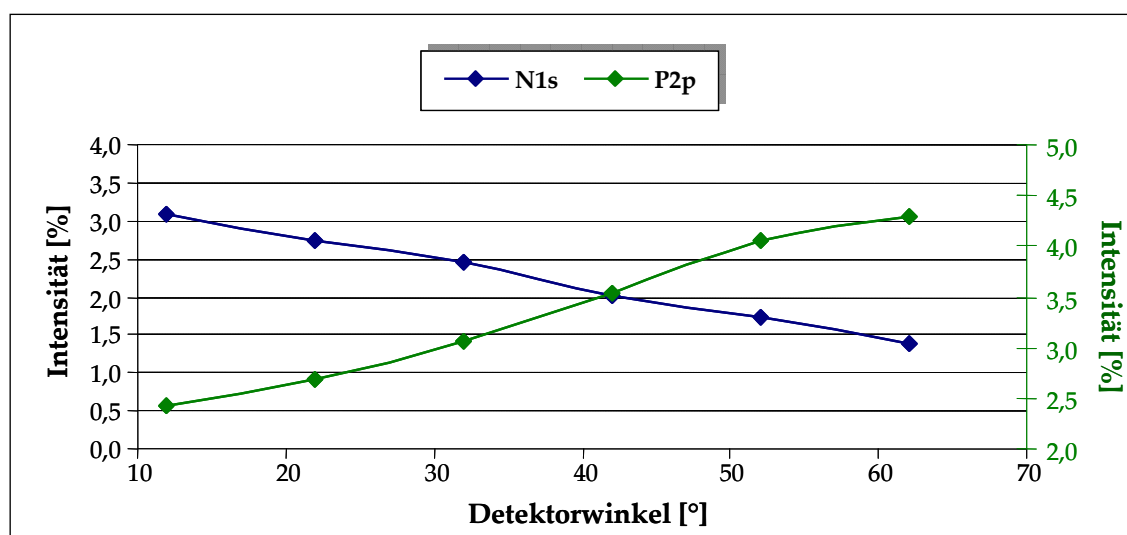


Abbildung 5-18: Darstellung der Intensitätsänderung der Elemente N und P aus der Monoschicht der Verbindung **NH₂-EG₃-C₁₇-PO₃H₂** während einer winkelabhängigen Messung.

Abbildung 5-18 zeigt exemplarisch für die Monoschichten der Amino-Spezies die Zunahme der Phosphor- und die Abnahme der Stickstoffintensität mit zunehmenden Detektorwinkel. Da das Stickstoffatom an dieser Stelle als Markeratom agierte, war in diesem Beispiel die Orientierung der Moleküle an der Substratoberfläche sehr gut zu erkennen. Demnach befanden sich die Phosphonsäuregruppe an der Titandioxidoberfläche und die Aminogruppe auf der Monoschicht.

Mit Hilfe von XPS-Untersuchungen konnten neben der Kontaktwinkelmessung und der Ellipsometrie ebenfalls die geeignete Adsorptionszeit zur Anbindung von Monoalkylphosphorsäure- und Alkylphosphonsäurederivaten an TiO₂-Oberflächen bestimmt werden. In Abbildung 5-19 erfolgte eine Gegenüberstellung der Ellipsometrie- sowie XPS-Daten aus einer adsorptionszeitabhängigen Untersuchung. Zur Bestimmung der Dicke der adsorbierten Monoschicht der Verbindung **COOH-EG₃-C₁₁-PO₄H₂** diente die Ellipsometrie. Das Intensitätsverhältnis C/Ti basierte auf zeitabhängigen XPS-Messungen. Aus der Abbildung ging

hervor, dass innerhalb der ersten Stunden eine starke Adsorption der SA-Moleküle auf der Oberfläche zu verzeichnen war. Zwischen einer Adsorptionszeit von 16h und 24h erfolgte nur noch eine geringe Zunahme der Adsorbatschicht. Demzufolge deuteten die Ergebnisse beider Methoden auf eine optimale Adsorptionszeit von 16h hin.

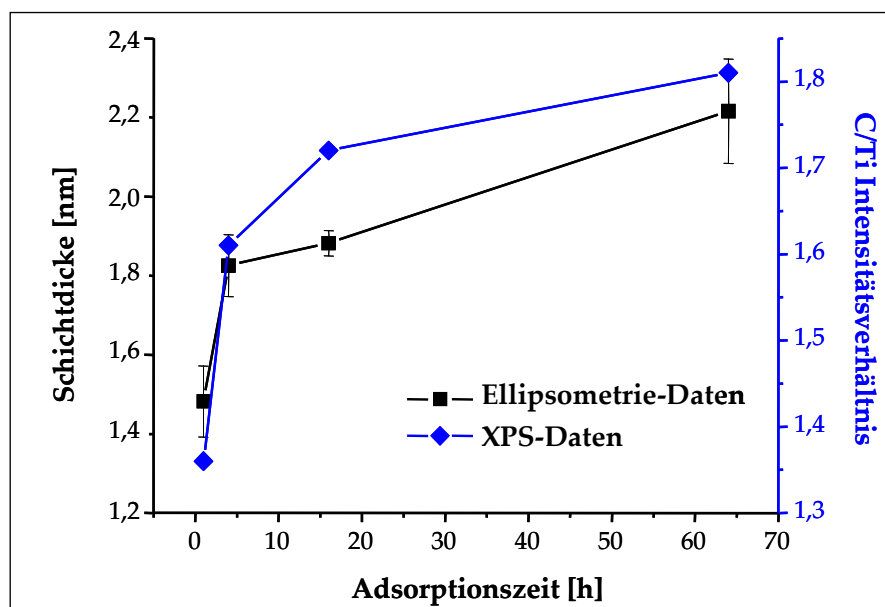


Abbildung 5-19: Gegenüberstellung adsorptionszeitabhängiger Ellipsometrie- und XPS-Daten von der Verbindung $\text{COOH-EG}_3\text{-C}_{11}\text{-PO}_3\text{H}_2$

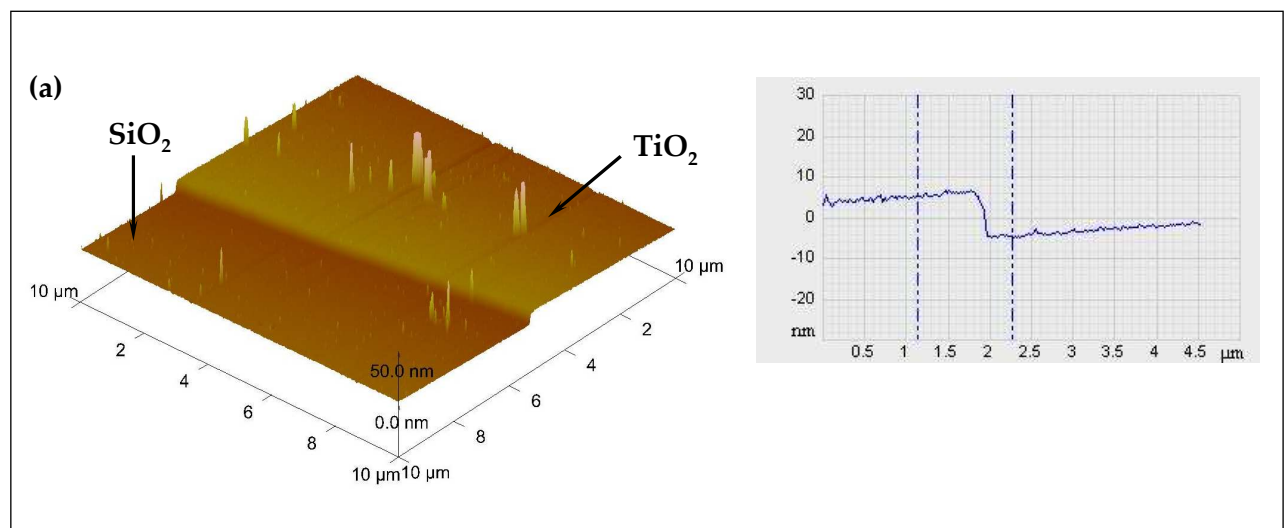
Aus den durchgeführten Untersuchungen ging hervor, dass alle synthetisierten SA-Moleküle erfolgreich aus wässriger Lösung auf metalloxidischen Substraten adsorbierten und somit ultradünne monomolekulare Schichten ausbildeten. Jedoch zeigten die Messergebnisse verschiedener analytischer Methoden wesentliche Unterschiede in der Qualität der Schichten der kurzkettigen und langkettigen Verbindungen. Die Referenzsubstanz **OPA** sowie die Verbindungen $\text{COOH-EG}_3\text{-C}_{17}\text{-PO}_4\text{H}_2$, $\text{COOH-EG}_3\text{-C}_{17}\text{-PO}_3\text{H}_2$, $\text{NH}_2\text{-EG}_3\text{-C}_{17}\text{-PO}_3\text{H}_2$ und $\text{COOH-C}_{17}\text{-PO}_3\text{H}_2$ zeigten homogene, gut orientierte, dicht gepackte SA-Monoschichten, aufgrund des langen Alkylspacers und der damit verbundenen starken Van-der-Waals- Wechselwirkungen zwischen den Molekülketten. Im Gegensatz dazu bildeten die kurzkettigen Verbindungen $\text{COOH-EG}_3\text{-C}_{11}\text{-PO}_4\text{H}_2$, $\text{COOH-EG}_3\text{-C}_{11}\text{-PO}_3\text{H}_2$ und $\text{NH}_2\text{-EG}_3\text{-C}_{11}\text{-PO}_3\text{H}_2$ ungeordnete, keine dicht gepackten SA-Schichten aus. Daraus konnte die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Länge der Alkylkette maßgeblich die Orientierung der Moleküle auf der Oberfläche beeinflusste. Mit winkelabhängigen XPS-Untersuchungen konnten die Elementzusammensetzung sowie die richtige Orientierung der adsorbierten Moleküle auf der Oberfläche festgestellt werden. Die Ergebnisse zeigten, dass sich die Phosphorsäure- bzw.

Phosphonsäuregruppen im substratnahen Bereich und die Carboxyl- bzw. Aminogruppen im Anschluss an den Alkylspacer und der Tri(ethylenglykol)-einheit auf der Monoschicht befanden. Es konnte demzufolge von einer erfolgreichen Adsorption der SA-Moleküle ausgegangen werden.

5.3.2 Selektive Anbindung auf strukturierten Oberflächen

Ein Ziel des Projektes EUROCORE SONS PROGRAMM NANO-SMAP war die selektive Anbindung von SA-fähigen Molekülen auf metalloxidischen Oberflächen wie TiO_2 und Al_2O_3 . Um diese Eigenschaft der synthetisierten Alkylphosphonsäuren zu testen, wurden Adsorptionen auf strukturierten Substraten $\text{TiO}_2/\text{SiO}_2$ durchgeführt. SiO_2 bildete dabei die Grundfläche und TiO_2 kleine quadratischen Strukturen mit einer Größe von $60 \times 60 \mu\text{m}$. Die resultierenden Schichten konnten mit Hilfe von AFM-Messungen untersucht werden. Dazu wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

Abbildung 5-20 zeigt beispielhaft die AFM-Bilder eines strukturierten Substrates vor bzw. nach der Adsorption der Verbindung $\text{COOH-EG}_3\text{-C}_{17}\text{-PO}_3\text{H}_2$. Es war eine deutliche Zunahme der Oberflächenrauigkeit auf den TiO_2 -Strukturen im Vergleich zum unmodifizierten Substrat erkennbar. Keine Änderung der Oberflächenbeschaffenheit war auf der glatten SiO_2 Grundfläche vor und nach der Adsorption zu beobachten. Das Höhenprofil zeigte außerdem eine Zunahme der Schichtdicke, die an der Kante zwischen Struktur und der Grundfläche vor (11 nm) und nach der Adsorption (14 nm) bestimmt wurde. Diese Differenz betrug 3 nm, was in etwa der Größe des adsorbierten SA-Moleküls entsprach.



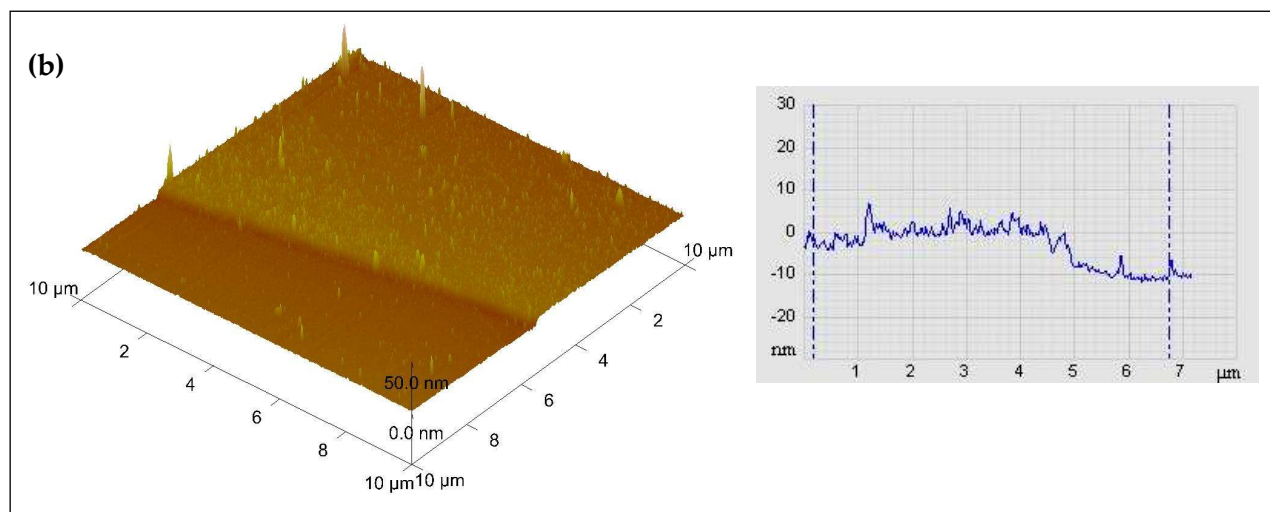


Abbildung 5-20: AFM-Bilder von einem strukturierten Substrat (a) vor und (b) nach der Adsorption von $\text{COOH-EG}_3\text{-C}_{17}\text{-PO}_3\text{H}_2$.

Aus diesen Untersuchungen ging hervor, dass die Alkylphosphonsäure selektiv an Oberflächen anbinden kann und somit eine Strukturierung der Oberfläche mit Hilfe dieser Moleküle möglich ist. Zur Absicherung dieser Ergebnisse müssen noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden, als geeignete Charakterisierungsmethoden würden sich da die Fluoreszenzmikroskopie sowie die Imaging-Ellipsometrie anbieten.

5.4 Stabilität der Monoschichten

Proteinadsorptionsuntersuchungen an modifizierten Oberflächen werden in Gegenwart von Pufferlösungen, welche beim physiologischen pH-Wert wirken, durchgeführt. Eine Voraussetzung zur Durchführung solcher Tests ist die Stabilität der adsorbierten Monoschicht auf metalloxidischen Oberflächen.

Auf TiO_2 - und Al_2O_3 -Oberflächen immobilisierte Alkylphosphon- und Monoalkylphosphorsäurederivate wurden mit verschiedenen Puffersystemen auf ihre Stabilität getestet. Zur Auslagerung der Substrate in den jeweiligen Pufferlösungen wurde ein Zeitraum von 2h gewählt (siehe Kapitel 4.2.2). Diese Zeit erwies sich als ausreichend, um über ein stabiles oder instabiles Verhalten der Monoschicht zu entscheiden. Die Charakterisierung der resultierenden Schichten erfolgte ex-situ mittels Spektroskopischer Ellipsometrie, XPS und in-situ mit der SPR-Spektroskopie.

5.4.1 Ergebnisse der Ellipsometrie

Alle dargestellten Verbindungen waren für Proteinadsorptionsversuche vorgesehen, deshalb wurden mit den in Kapitel 5.3 vollständig charakterisierten Monoschichten Stabilitätstest in den Puffersystemen: HEPES2, PBS und Tris bei pH 7,4 durchgeführt. Die dargestellten Ergebnisse setzen sich dabei aus den Mittelwerten aus vier durchgeführten Untersuchungen zusammen.

Aus Abbildung 5-21 geht hervor, dass die Verbindung **COOH-EG₃-C₁₁-PO₄H₂** ein sehr instabiles Verhalten auf TiO₂-Oberflächen gegenüber allen getesteten Pufferlösungen zeigte. Nach einer Auslagerung von 2h war ein fast vollständiger Verlust dieser Schicht zu beobachten. Da diese Instabilität in Zusammenhang mit einer inhomogenen, nicht dicht gepackten Schicht steht, wurden verschiedene Adsorptionsvarianten getestet, um die Stabilität dieser Monoschicht zu erhöhen. So erfolgten zum Beispiel Adsorptionen bei erhöhten Temperaturen (50°C), unter Ultraschall, aus unpolaren Lösungsmitteln (n-Heptan/*iso*-Propanol), Temperung der gebildeten Monoschichten bei 50°C im Vakuum sowie Durchführung von Coadsorptionen mit der Verbindung **OPA** in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen. Aus dem dennoch sehr schlechten Stabilitätsverhalten zogen wir den Schluss, die Verbindung zu modifizieren, um eine homogene Schicht sowie einen hohen Grad an Oberflächenbedeckung zu erzielen. Es erfolgten Veränderungen innerhalb der Molekülstruktur: die Einführung der Phosphonsäuregruppe und die Erhöhung des hydrophoben Anteils und somit der Van-der-Waals-Wechselwirkungen durch eine Verlängerung des Spacers von 11 auf 17 CH₂-Wiederholeinheiten. Diese Monoschichten zeigten, wie in Abbildung 5-21 dargestellt, ein unterschiedliches Verhalten in Pufferlösungen.

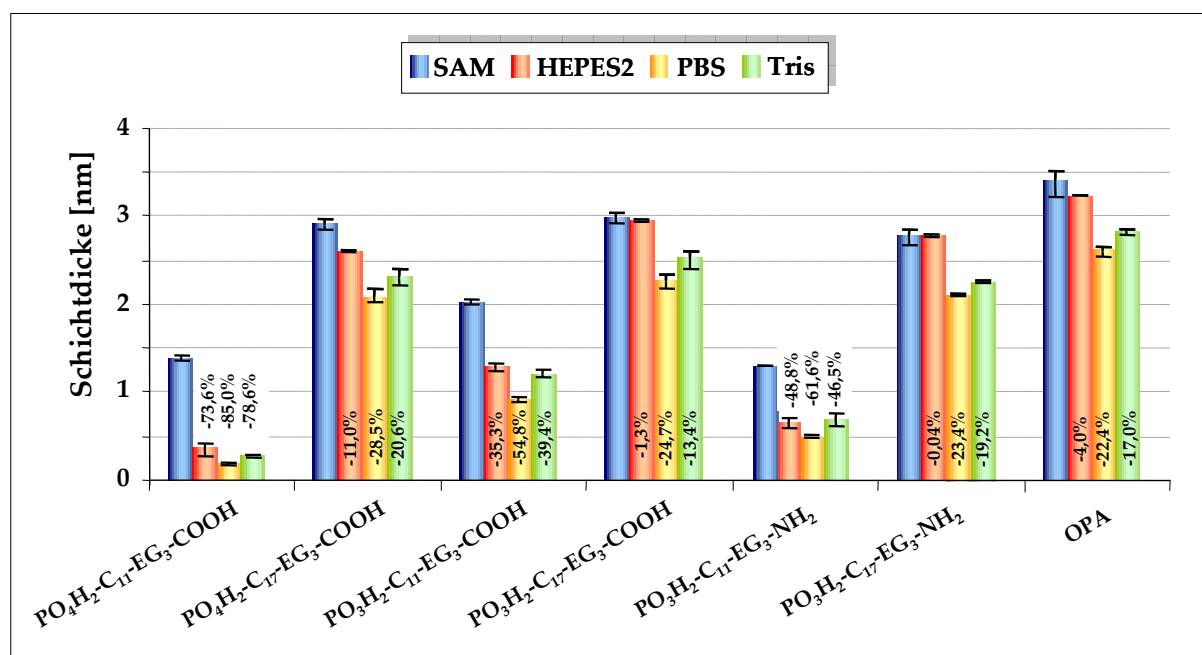


Abbildung 5-21: Graphische Darstellung der Ellipsometrieergebnisse aus den Stabilitätstests der Monoschichten gegen HEPES2-, PBS- und Tris-Puffer.

Die Monoschichten der kurzkettigen Phosphorsäurederivate zeigten im Vergleich zur Verbindung $\text{COOH-EG}_3\text{-C}_{11}\text{-PO}_4\text{H}_2$ ein stabileres Verhalten gegenüber Pufferlösungen. Vor allem in HEPES2- und Tris-Puffer betrug der Verlust der Monoschicht der Verbindung $\text{COOH-EG}_3\text{-C}_{11}\text{-PO}_3\text{H}_2$ 35% bzw. 39% im Gegensatz zur verwendeten Phosphorsäure-Spezies, die einen Verlust von 74% bzw. 79% zu verzeichnen hatte. Betrachtet man die Schichtdicken der langkettigen Verbindungen, so zeigten diese ein sehr stabiles Verhalten, vor allem in HEPES2-Puffer. Aber auch hier traten wieder Unterschiede zwischen der Phosphonsäure- und Phosphorsäure-Spezies auf, letztgenannte hatte ein Verlust von 11%. Die beiden Verbindungen $\text{COOH-EG}_3\text{-C}_{17}\text{-PO}_3\text{H}_2$ und $\text{NH}_2\text{-EG}_3\text{-C}_{17}\text{-PO}_3\text{H}_2$ wiesen ein Defizit von 1,3% bzw. 0,04% im Vergleich zu den Ausgangsschichtdicken der Monoschichten auf. Der Grund für das Verhalten der adsorbierten Verbindungen gegenüber den verwendeten Puffersystemen liegt zum Einen im Molekülaufbau der SA-Moleküle und der Qualität der ausgebildeten Schichten und zum Anderen bei der Wirkungsweise des Puffers. PBS gehört zu den Standardpuffersystemen für biologische Anwendungen. Allerdings besitzen Phosphationen eine hohe Affinität zu Metalloxidoberflächen und stellen im Zusammenhang mit der Adsorption von Alkylphosphorsäuren und -phosphonsäuren eine Konkurrenz dar. HEPES2 ist ein organisches Puffersystem. Im Vergleich zu den Phosphationen geht die Sulfonsäuregruppe in diesem System eher schwache Wechselwirkungen mit metalloxidischen Oberflächen ein. Tris ist ebenfalls eine für biochemische Zwecke häufig verwendete Puffersubstanz und besitzt keine

funktionellen Gruppen, die eine Adsorption an metalloxidischen Oberflächen beeinflussen könnten. Die Stabilität der Monoschichten konnte durch die Einführung der Phosphonsäuregruppe als Haftgruppe verbessert werden. Ein wesentlich stabileres Verhalten zeigten die Verbindungen mit 17 Kohlenstoffeinheiten im Alkylspacer, vor allem die Substanz **COOH-EG₃-C₁₇-PO₃H₂**.

Neben der Untersuchung des Stabilitätsverhaltens der Monoschichten in Pufferlösungen wurden auch Tests zum Langzeitstabilitätsverhalten der SA-Schichten in verschiedenen Lösungsmitteln getestet, welche sich in ihrem polaren Charakter unterschieden. Die Auslagerungszeit der modifizierten Substrate betrug dabei 24h, die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 5-22 dargestellt.

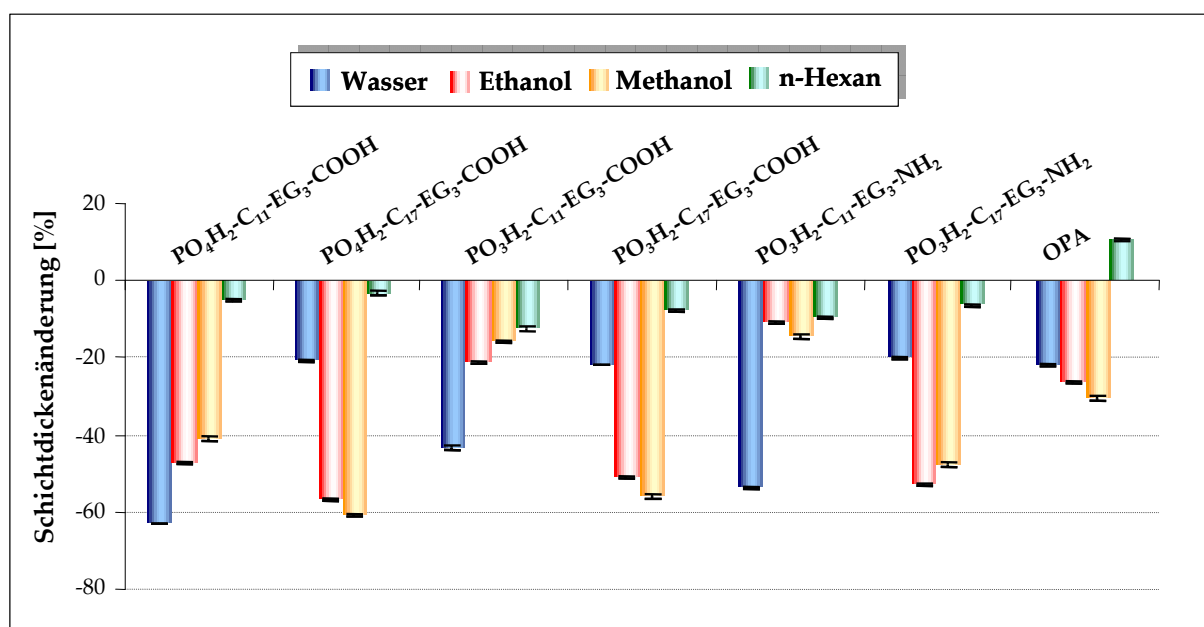


Abbildung 5-22: Graphische Darstellung des Schichtdickenänderung aus den Untersuchungen des Langzeitstabilitätsverhaltens der einzelnen Monoschichten in Wasser, Ethanol, Methanol und n-Hexan.

Ähnlich dem Verhalten der Monoschichten in Pufferlösungen konnte bei dem Langzeitstabilitätstest eine höhere Instabilität der C₁₁-Spezies im Vergleich zu den C₁₇-Verbindungen und zur Referenzsubstanz festgestellt werden. Der höchste Schichtdickenverlust fand bei den kurzkettigen SA-Schichten in Wasser statt. Sehr stark desorbierten diese Schichten auch in den polaren Lösungsmitteln Ethanol und Methanol, was mit der ausgezeichneten Löslichkeit dieser Verbindungen in den jeweiligen Lösungsmitteln begründet werden kann, als auch mit der höheren Hydrolyseempfindlichkeit der adsorbierten Kopfgruppe, die auf Grund der nicht dicht gepackten Schicht leichter angreifbar wurde. Im Gegensatz dazu steht die

Stabilität der Schichten der C₁₁- sowie C₁₇-Spezies im unpolaren Lösungsmittel n-Hexan, wobei ein sehr geringer Verlust der Schichtdicken beobachtet wurde. Diese Tatsache könnte mit der hydrophilen Tri(ethylenglykol)-Einheit begründet werden, die als eine Barriere wirkt und somit das Eindringen der unpolaren Lösungsmittelmoleküle in die SA-Schicht verhindert. Die geringe Änderung der Schichtdicken könnte dann an einer Konformationsänderung der immobilisierten Moleküle auf der Oberfläche gelegen haben. Bei der **OPA**-Monoschicht war eine Erhöhung der Schichtdicke zu beobachten, was auf eine Einlagerung von Lösungsmittelmolekülen zwischen den unpolaren Alkylketten zurückgeführt werden kann, die somit eine Quellung der Schicht förderten und eine Desorption des immobilisierten Phosphonsäurederivates nicht stattfand. Sehr instabil verhielten sich die C₁₇-Spezies gegenüber Ethanol und Methanol, welche sehr gute Lösungsmittel der jeweiligen Verbindungen darstellten.

Des Weiteren wurde exemplarisch ein 24h Stabilitätstest der Monoschicht der Verbindung **COOH-EG₃-C₁₇-PO₃H₂** gegenüber HEPES2 durchgeführt. Es zeigten sich dabei keine signifikanten Unterschiede in den Schichtdicken vor und nach der Auslagerung, d.h. die Monoschicht verhielt sich auch über einen längeren Zeitraum stabil in dem Puffersystem.

Tabelle 5-11: Gegenüberstellung der Schichtdicken der SA-Schicht der Verbindung **COOH-EG₃-C₁₇-PO₃H₂** nach der Adsorption, nach 2h sowie 24h Auslagerung in HEPES2-Puffer

Verbindung	d [nm] <i>nach Adsorption</i>	d [nm] <i>nach 2h HEPES2</i>	d [nm] <i>nach 24h HEPES2</i>
COOH-EG₃-C₁₇-PO₃H₂	2,97±0,1	2,96±0,1	2,96±0,2

Für die Monoschicht der Verbindung **COOH-EG₃-C₁₇-PO₃H₂** wurde weiterhin exemplarisch das Stabilitätsverhalten dieser Schicht in HEPES2-Pufferlösungen in Abhängigkeit vom pH-Wert untersucht. Dazu wurden die Schichten auf TiO₂-Substrate adsorbiert und anschließend 2h in den entsprechenden Pufferlösungen ausgelagert. Im Allgemeinen war der Schichtdickenverlust sehr gering, der höchste wurde bei pH 3; 5 sowie 8 festgestellt, was eventuell auf eine Konformationsänderung der Moleküle auf der Oberfläche zurückzuführen ist. Bei pH 4, was dem Wert der Adsorptionslösung sowie dem IEP von TiO₂ entsprach und pH 6 zeigten die Schichten eine hohe Stabilität. Beim physiologischen pH-Wert wurde eine sehr geringe Abnahme der Schicht um 0,13% festgestellt (siehe Abbildung 5-23).

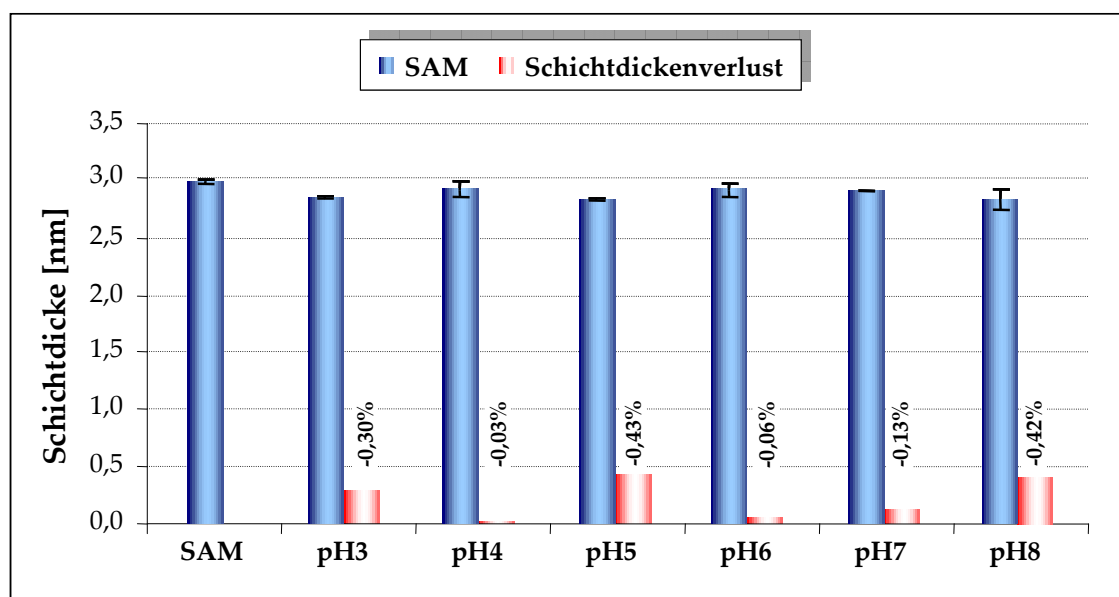


Abbildung 5-23: Graphische Darstellung des Stabilitätsverhaltens der $\text{COOH-EG}_3\text{-C}_{17}\text{-PO}_3\text{H}_2$ Monoschicht in HEPES2-Pufferlösungen bei unterschiedlichen pH-Werten.

5.4.2 Ergebnisse der XPS-Untersuchung

Mit Hilfe von hochaufgelösten XPS-Untersuchungen konnte die elementare Zusammensetzung der SA-Schichten der Verbindungen $\text{COOH-EG}_3\text{-C}_{11}\text{-PO}_4\text{H}_2$, $\text{COOH-EG}_3\text{-C}_{17}\text{-PO}_4\text{H}_2$, $\text{COOH-EG}_3\text{-C}_{11}\text{-PO}_3\text{H}_2$ und $\text{COOH-EG}_3\text{-C}_{17}\text{-PO}_3\text{H}_2$ vor und nach einer Auslagerung in HEPES2 Puffer ermittelt werden.

Tabelle 5-12: Vergleich der experimentell ermittelten Elementzusammensetzungen der SA-Schichten auf TiO_2 (theoretische Werte) mit den SAMs nach 2h Auslagerung in HEPES2

Verbindung	SAMs nach 16h Adsorption			SAMs nach 16h HEPES2		
	C [At%]	O [At%]	P [At%]	C [At%]	O [At%]	P [At%]
$\text{COOH-EG}_3\text{-C}_{11}\text{-PO}_4\text{H}_2$	61,9 (63,3)	34,3 (33,3)	3,3 (3,3)	15,5	11,7	0,0
$\text{COOH-EG}_3\text{-C}_{17}\text{-PO}_4\text{H}_2$	70,7 (69,4)	26,4 (27,8)	2,8 (2,8)	66,8	23,6	2,4
$\text{COOH-EG}_3\text{-C}_{11}\text{-PO}_3\text{H}_2$	65,6 (65,5)	32,9 (31,0)	3,0 (3,4)	33,4	15,5	1,4
$\text{COOH-EG}_3\text{-C}_{17}\text{-PO}_3\text{H}_2$	70,3 (71,4)	26,4 (25,7)	3,2 (2,9)	68,7	24,3	2,6

Anhand der in Tabelle 5-12 aufgeführten Werte war deutlich das instabile Verhalten der kurzkettigen Verbindungen gegenüber HEPES2 ersichtlich, dennoch wies das

Phosphonsäurederivat eine höhere Atomkonzentration an Kohlenstoff, Sauerstoff und Phosphor auf als das vergleichbare Phosphorsäurederivat. Bei den langkettigen Verbindungen zeigte der Phosphonsäureester ein stabiles Verhalten, das entsprechende Alkylphosphorsäurederivat dagegen nur eine begrenzte Stabilität.

Demzufolge war das stabile Verhalten der adsorbierten Spezies von der Länge des Alkylspacers und somit von der Qualität der Monoschicht aufgrund der damit verbundenen Van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen den Molekülketten auf der Oberfläche sowie von der Art der oberflächenaktiven Kopfgruppe abhängig.

5.4.3 Ergebnisse der SPR-Spektroskopie

Mit den zeitabhängigen SPR-Messungen konnte das Stabilitätsverhalten der Monoschichten gegenüber den drei Puffersystemen sehr gut untersucht werden. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

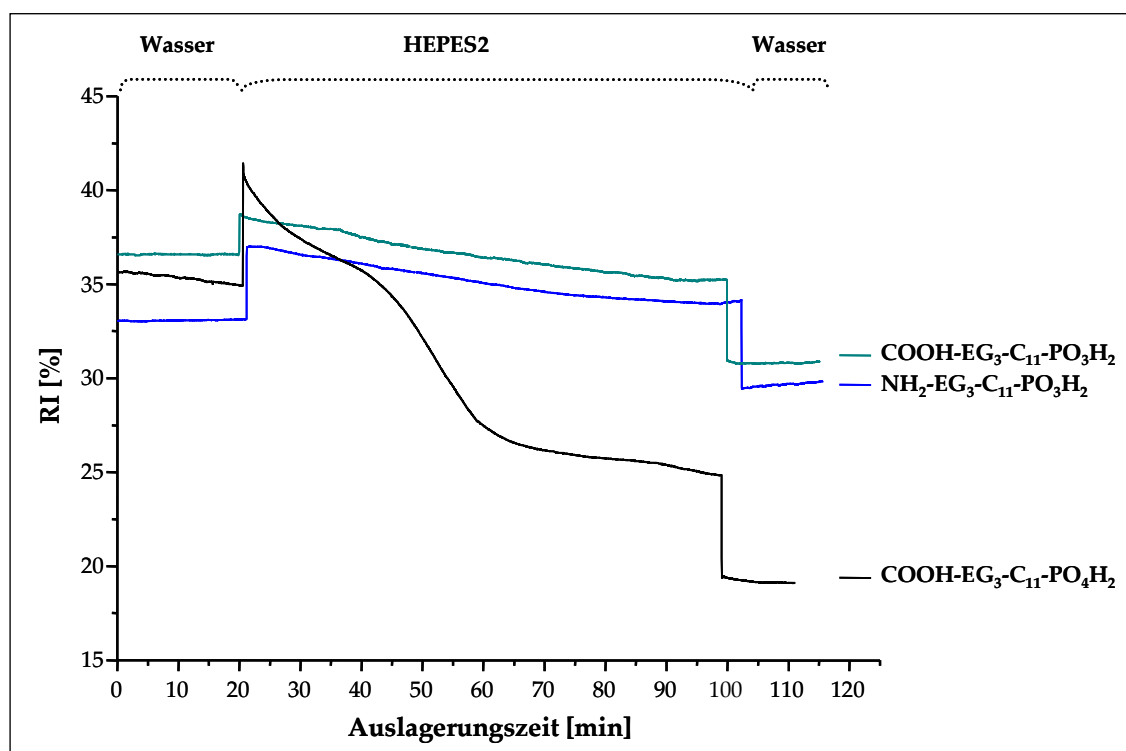


Abbildung 5-24: Desorptionskurven der SAMs der Verbindungen $\text{COOH-EG}_3\text{-C}_{11}\text{-PO}_4\text{H}_2$, $\text{COOH-EG}_3\text{-C}_{11}\text{-PO}_3\text{H}_2$ und $\text{NH}_2\text{-EG}_3\text{-C}_{11}\text{-PO}_3\text{H}_2$ während des Stabilitätstest gegen HEPES2-Puffer.

In Abbildung 5-24 sind das Verhalten der SAMs der Verbindungen $\text{COOH-EG}_3\text{-C}_{11}\text{-PO}_4\text{H}_2$, $\text{COOH-EG}_3\text{-C}_{11}\text{-PO}_3\text{H}_2$ und $\text{NH}_2\text{-EG}_3\text{-C}_{11}\text{-PO}_3\text{H}_2$ während des Stabilitätstest gegen HEPES2-

Puffer dargestellt. In den Puffersystemen Tris und PBS traten ebenfalls Desorptionsprozesse ein, die den Kurvenverläufen in Abbildung 5-24 ähneln.

Die in Abbildung 5-24 dargestellten SPR-Sensogramme beginnen mit einem Plateau, das dem Equilibrierungszeitraum der Monoschichten in Wasser entspricht. Bei der SA-Schicht der Verbindung **COOH-EG₃-C₁₁-PO₄H₂** waren während dieses Zeitraums erste Verringerungen der Schicht zu verzeichnen. Nach 20min erfolgte ein steiler Anstieg der Kurve, was auf die Zugabe des HEPES2-Puffers und einer damit verbundenen Konzentrationsänderung zurückzuführen war. Ab diesem Zeitpunkt begann die Desorption der immobilisierten Monoschicht. Nach dem Spülen der Messzelle lag die reflektierte Intensität des Laserstrahls deutlich unter dem Ausgangsniveau. Alle drei Verbindungen waren instabil auf der Oberfläche gebunden, die Desorptionskurven zeigten dennoch einen Unterschied zwischen der Monoalkylphosphorsäure- und den Alkylphosphonsäure-Spezies. Die erst genannte Verbindung desorbierte deutlich stärker von der Oberfläche als die anderen beiden, was auf eine geringere Hydrolyseempfindlichkeit der adsorbierten Phosphonsäuregruppe hindeutete. Die Hydrolyse der immobilisierten Phosphorsäure- bzw. Phosphonsäuregruppen war durch eine unvollständig bedeckte Oberfläche leichter möglich, da die Lösungsmittelmoleküle die hydrophobe Barriere der locker angeordneten Alkylketten überwinden und somit leicht in die Schicht eindringen konnten.

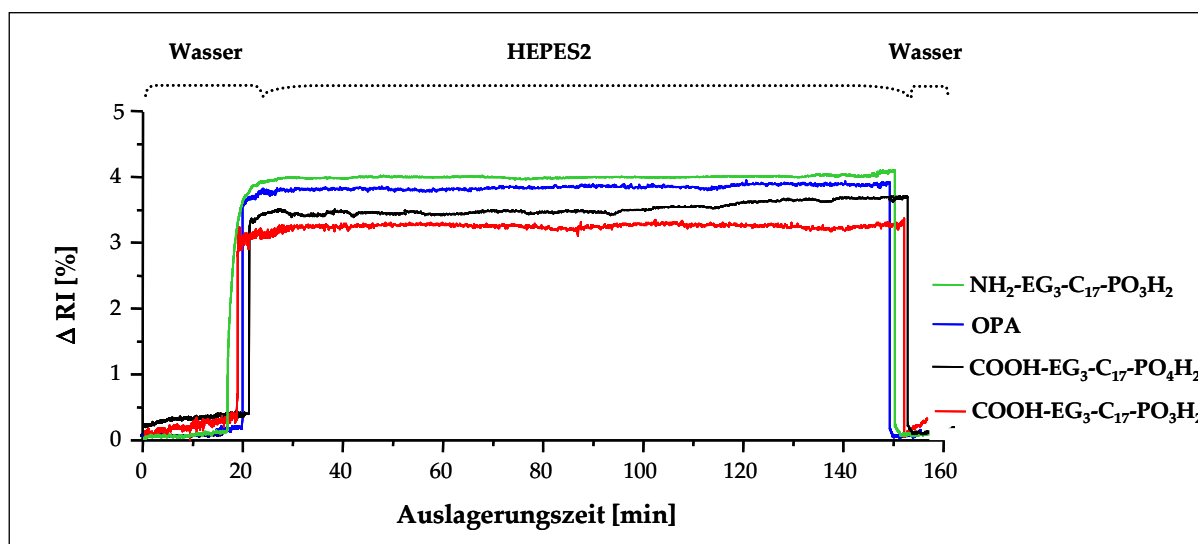


Abbildung 5-25: Verhalten der SAMs der Verbindungen **COOH-EG₃-C₁₇-PO₄H₂**, **COOH-EG₃-C₁₇-PO₃H₂**, **NH₂-EG₃-C₁₇-PO₃H₂** und **OPA** während des Stabilitätstest gegen HEPES2-Puffer.

Abbildung 5-25 zeigt das Stabilitätsverhalten der SAMs der Verbindungen **COOH-EG₃-C₁₇-PO₄H₂**, **COOH-EG₃-C₁₇-PO₃H₂**, **NH₂-EG₃-C₁₇-PO₃H₂** und der Referenzsubstanz **OPA** gegenüber

HEPES2-Puffer. Ausgehend von einem Plateau bei $\Delta RI = 0\%$, d.h. dem Equilibrierungsprozess der Monoschicht gegen Wasser für 20min, erfolgte danach die Zugabe der Pufferlösung. Das äußerte sich in einem kurzen, steilen Anstieg der Kurve aufgrund von Konzentrations- und Brechungsindexunterschieden der Lösungen. Während der Auslagerungszeit von 2h bildete sich ein Plateau aus, was für eine stabile Schicht sprach. Nach dem Spülen des Substrates mit Wasser wurde das Ausgangsniveau wieder erreicht, das ebenfalls auf keinen Verlust der Monoschicht hindeutete.

Die sehr gute Stabilität der Schichten war auf eine nur sehr schwer mögliche Desorption der immobilisierten Phosphonsäure- und Phosphorsäuregruppen zurückzuführen, da die dicht nebeneinander angeordneten hydrophoben Alkylketten eine natürliche Barriere für Lösungsmittelmoleküle darstellten.

Ein instabileres Verhalten zeigten die SA-Schichten der langkettigen Phosphonsäurederivate in den Puffersystemen PBS sowie Tris. Nach der Equilibrierung des Substrates in Wasser begann mit der Zugabe der jeweiligen Pufferlösungen die langsame Desorption der Monoschichten.

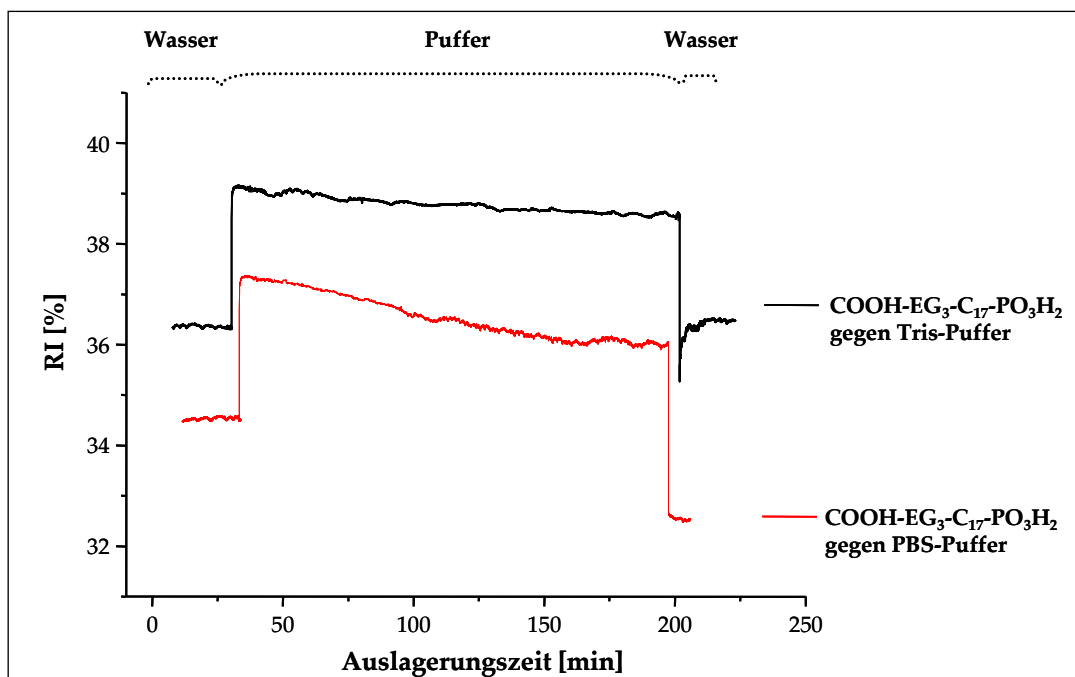


Abbildung 5-26: Verhalten der SAMs der Verbindung $\text{COOH-EG}_3\text{-C}_{17}\text{-PO}_3\text{H}_2$ in PBS- und Tris-Puffer.

In Abbildung 5-26 ist das Verhalten der Verbindung $\text{COOH-EG}_3\text{-C}_{17}\text{-PO}_3\text{H}_2$ in PBS- und Tris-Puffern dargestellt. Beim Betrachten des SPR-Sensogramms wird eine unterschiedlich starke Abnahme der Kurven deutlich. Aufgrund der hohen Konzentration an Phosphationen im PBS-Puffer, die eine hohe Affinität zu Metalloxidoberflächen besitzen, liefen während dieses

Auslagerungsprozesses Konkurrenzreaktionen zwischen Alkylphosphonaten und dem Puffer ab. Die Monoschicht desorbierte stärker als bei einer Auslagerung in Tris-Puffer, der keine konkurrenzfähigen Gruppen enthielt.

Die Spektren der winkelabhängigen Scanmessungen zeigten beim Vergleich der Kurven vor und nach der Auslagerung keine Verschiebung der Minima, im Gegensatz zu den kurzkettigen Verbindungen. Die Minima dieser Spezies lagen nach dem Auslagerungsprozess zu niedrigeren Winkeln hin verschoben, was eine partielle Desorption der Monoschichten bestätigte.

Aus den durchgeführten Untersuchungen ging hervor, dass die langkettigen Phosphonsäure-Spezies durch die Ausbildung homogener, dicht gepackter Monoschichten eine viel höhere Stabilität und damit geringere Hydrolyseempfindlichkeit aufwiesen als die Schichten der vergleichbaren Monoalkylphosphorsäureverbindung. Die Monoschichten zeigten in HEPES2-Puffer ein stabileres Verhalten als in Tris- oder PBS-Puffer, deshalb wurde HEPES2 als favorisiertes Puffersystem in nachfolgenden Proteinversuchen angewandt. Die kurzkettigen Spezies zeigten insgesamt ein instabiles Verhalten gegenüber den verwendeten Puffersystemen. Demzufolge wurden die in Kapitel 5.5 aufgeführten Proteinversuche ausschließlich mit den Verbindungen **COOH-EG₃-C₁₇-PO₄H₂**, **COOH-EG₃-C₁₇-PO₃H₂** und **NH₂-EG₃-C₁₇-PO₃H₂** sowie der Referenzsubstanz **OPA** durchgeführt.

Die SA-Schicht der Verbindung **COOH-C₁₇-PO₃H₂** wurde nicht auf Stabilität gegenüber Pufferlösungen getestet, weil aufgrund des stabilen Verhaltens der anderen C₁₇-Spezies gegenüber HEPES2 auf ein ähnliches Ergebnis zurückgeschlossen werden konnte. Des Weiteren wurde die Monoschicht dieser Verbindung nicht direkt für Proteinversuche genutzt sondern in modifizierter Form, d. h. nach der Anbindung von Hexa(ethylenglykol) sowie hochverzweigtem Polyglycidol. Das Stabilitätsverhalten dieser Spezies sowie der **COOH-C₁₇-PO₃H₂**-Monoschicht zeigte der Verlauf der SPR-Kinetikspektren bei den entsprechenden Versuchen zur Anbindung der Ethylenglykolverbindungen sowie zur unspezifischen Proteinanbindung mit BSA (Kapitel 5.5.1.3).

5.5 Proteinadsorptionsuntersuchungen

Bei den Versuchen zur Proteinadsorption wurde zwischen einer unspezifischen und einer spezifischen Anbindung von Proteinen an einer modifizierten Substratoberfläche unterschieden. Die Proteine, die zu den unspezifischen Adsorptionstests herangezogen wurden, banden infolge einer Vielzahl von nicht definierten Wechselwirkungskräften an die funktionellen Gruppen der Substratoberfläche an. Diese Proteine, wie zum Beispiel BSA, Fibrinogen oder Hämoglobin sind aus Polypeptidketten, die wiederum aus vielen unterschiedlichen Aminosäuren bestehen, aufgebaut. Diese Aminosäuren besaßen verschiedene funktionelle Einheiten, mit denen eine direkte, definierte Anbindung an der carboxyl- oder aminoterminierten Oberfläche nicht möglich war. Zur spezifischen Immobilisierung wurden Proteine verwendet, die aus Aminosäuren aufgebaut waren, die lediglich nur eine definierte funktionelle Gruppe aufwiesen und somit direkt an die carboxyl- oder aminoterminierte Oberfläche anbanden. Eine definierte Anbindung war auch über spezifische Wechselwirkungen möglich, wie sie zum Beispiel zwischen Biotin und Streptavidin [11] zu finden sind.

In Tabelle 4-4 (Kapitel 4.2.3) sind alle zur Anwendung gekommenen Proteine aufgeführt. Sämtliche Proteinversuche erfolgten in Gegenwart von HEPES2-Puffer bei pH 7,4. Zu Beginn des jeweiligen Versuchs wurde das modifizierte Substrat zur Equilibrierung für 2h im Puffersystem und nach erfolgter Zugabe der Proteinlösung für 20min dort belassen. Proteinadsorptionen verlaufen an organischen Oberflächen spontan innerhalb der ersten Minuten, deshalb war diese Zeit für unspezifische Adsorptionstests ausreichend. Bei der spezifischen Immobilisierung von Proteinen erfolgte nach einer Aktivierung der Oberfläche die Zugabe der Proteinlösung mit einer anschließenden Reaktionszeit von 2h.

5.5.1 Unspezifische Proteinadsorption

5.5.1.1 Ergebnisse der ex-situ-Ellipsometrie

Ellipsometrische Untersuchungen zum unspezifischen Anbindungsverhalten verschiedener Proteine fanden auf modifizierten TiO₂-Substraten statt. Dazu wurden die Verbindungen **COOH-EG₃-C₁₇-PO₄H₂**, **COOH-EG₃-C₁₇-PO₃H₂** und **NH₂-EG₃-C₁₇-PO₃H₂** sowie die Referenzsubstanz **OPA** auf den Substraten immobilisiert und nach einer entsprechenden Equilibrierungszeit in HEPES2-Puffer in BSA sowie FHS-Lösung ausgelagert. Bei den

Ergebnissen der ellipsometrischen Untersuchungen handelt es sich um die Mittelwerte aus mindestens vier Bestimmungen.

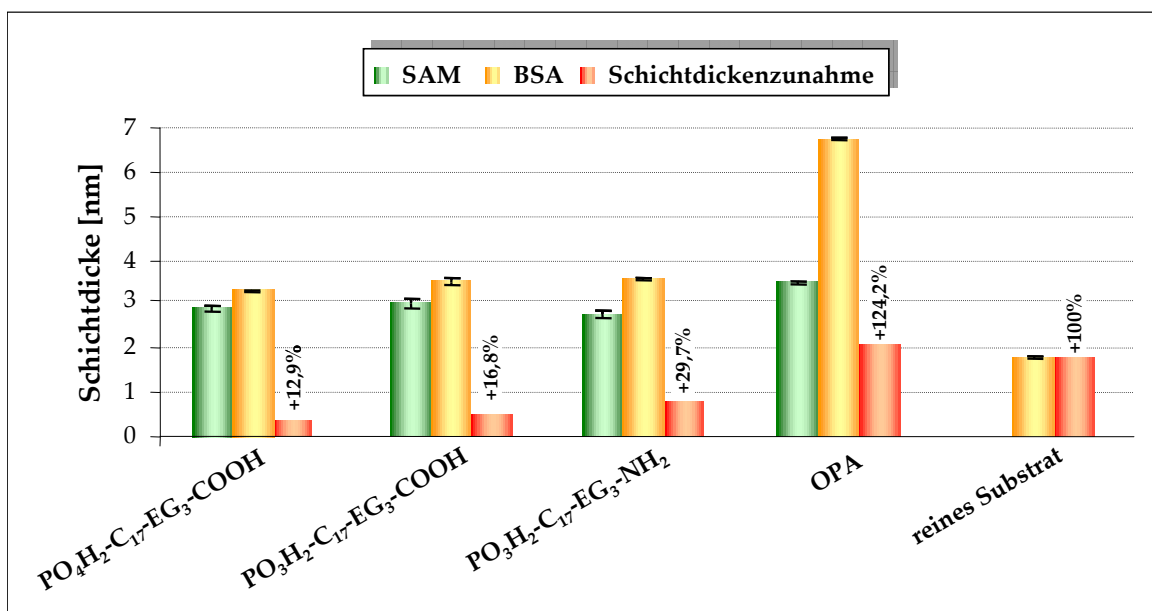


Abbildung 5-27: Verhalten der SAMs gegenüber BSA im Vergleich zum gereinigten, unmodifizierten Substrat.

Unspezifische Proteinadsorptionen sind ein komplexes Thema und können generell mit der Kombination von zwei verschiedenen Prozessen beschrieben werden: der Adsorption durch Ladungswechselwirkungen zwischen Substrat und Protein und der Adsorption durch hydrophobe Wechselwirkungen [126]. BSA ist ein relativ kleines Protein, das eine hohe Diffusionsgeschwindigkeit besitzt und schnell an der Substratoberfläche anbinden kann. Das Protein wirkt amphoter, d.h. es kann sowohl als Kation als auch Anion fungieren. Der IEP von BSA liegt zwischen 4,7-4,9. Da bei einem pH-Wert von 7,4 gearbeitet wurde, lag demzufolge das Protein als Anion vor. In Abbildung 5-27 werden die unterschiedlichen Zunahmen der Schichtdicken nach einer Auslagerung der SAMs in BSA deutlich. Die Proteine zeigten eine bedeutend geringere Affinität zu den Tri(ethylenglykol)-terminierten SA-Schichten mit einem Kontaktwinkel von $\sim 65^\circ$ im Gegensatz zur stark hydrophoben Monoschicht der Verbindung **OPA** ($\theta=103^\circ$). Die unspezifische Proteinadsorption konnte somit aufgrund der hydrophilen Ethylenglykol-Einheit deutlich zurückgedrängt aber durch die terminalen funktionellen Gruppen nicht ganz verhindert werden. Das BSA-Molekül kann bedingt durch die Tertiärstruktur seiner Polypeptidkette sowohl mit der COOH-Gruppe als auch mit der NH_2 -Gruppe kovalente Bindungen (Peptidbindungen) ausbilden. Die Polypeptidkette kann dabei so

angeordnet sein, dass sich der hydrophobe Bereich des Proteinmoleküls bevorzugt im Zentrum des Knäuels befand, dagegen die hydrophilen sowie geladenen Gruppen an der Außenseite. Die hydrophobe SA-Schicht der Referenzsubstanz hatte eine Schichtdickenzunahme von 124% zu verzeichnen, was die Annahme von *Withesides et al.* [126] für negative geladene Proteine bestätigte. Seinen Beobachtungen zufolge, stieg die Menge des adsorbierten Proteins mit zunehmendem Wasserkontaktwinkel an. Besonders bei diesen hydrophoben Oberflächen bestand für die immobilisierten, flexiblen Proteine die Möglichkeit, sich nach einer gewissen Verweilzeit an der Oberfläche zu deformieren und weitere Bindungen zum Substrat auszubilden. Dadurch kam es zu einer Umorientierung im Gerüst der adsorbierten BSA-Moleküle und somit zu günstigen Wechselwirkungen zu den hydrophoben Proteinbereichen, die in wässriger Lösung durch die Faltung der Polypeptidkette besonders im Kernbereich des Moleküls zu finden waren. Aufgrund der starken Schichtdickenzunahme der Adsorbatschicht der Verbindung **OPA** und einer damit verbundenen hohen Packungsdichte der BSA-Moleküle könnten zusätzlich zu den Protein/Substrat-Wechselwirkungen auch Protein/Protein-Wechselwirkungen innerhalb des Adsorbates eine Rolle (Gelbildung) gespielt haben.

Reines TiO_2 besitzt einen IEP zwischen 3,5 – 6,7. Nach *Textor et al.* [18] konnte bei dem physiologischen pH-Wert von 7,4 eine hohe Anzahl an Hydroxygruppen sowie eine geringe negative Ladung der Titandioxidoberfläche beobachtet werden. Demzufolge wies die reine aktivierte Substratoberfläche eine sehr hohe Ladungsdichte auf, was sich, wie in Abbildung 5-27 dargestellt, in starken Wechselwirkungen bzw. zur Ausbildung kovalenter Bindungen zwischen dem Protein BSA und dem Substrat äußerte.

Des Weiteren wurde exemplarisch das Verhalten der SA-Schichten der Verbindungen **COOH-EG₃-C₁₇-PO₃H₂** und **OPA** gegenüber Vollständigem Menschlichem Serum (FHS) auf TiO_2 -Substraten getestet. Das FHS eignete sich sehr gut zu den Adsorptionsversuchen mit unspezifisch wirkenden Proteinen, da es das gesamte Spektrum an Proteinen des menschlichen Blutes außer Hämoglobin beinhaltet und somit sehr nahe an der Realität hinsichtlich einer späteren Anwendung als Implantatmaterial liegen würde. FHS entspricht einem komplexen Proteingemisch, das oft aus mehr als hundert Einzelproteinen besteht. Abbildung 5-28 zeigt die Ergebnisse aus der ellipsometrischen Bestimmung. Aus ihnen wurde ersichtlich, dass wiederum an die hydrophobe Schicht der Verbindung **OPA** als auch an das reine Substrat eine hohe, annähernd gleiche Menge an Proteinen gebunden wurde. Aufgrund der Vielfältigkeit

dieser Proteinlösung hinsichtlich der Ladungen der Proteine, Größe als auch Funktionalitäten, stieg ebenso die immobilisierte Proteinmenge an der Tri(ethylenglykol)-terminierten Schicht um ein beträchtliches Vielfache im Vergleich zum BSA-Adsorptionsversuch an. Jedoch konnte in Analogie zur **OPA**-Schicht die unspezifische Proteinadsorption aus dem FHS aufgrund der hydrophilen Ethylenglykol-Einheit, entschieden zurückgedrängt werden. Durch die kompetitive Adsorption der zahlreichen verschiedenen Proteine mit jeweils unterschiedlich starker Substratbindungen und Kinetiken wurden die Prozesse an der Oberfläche wesentlich komplizierter.

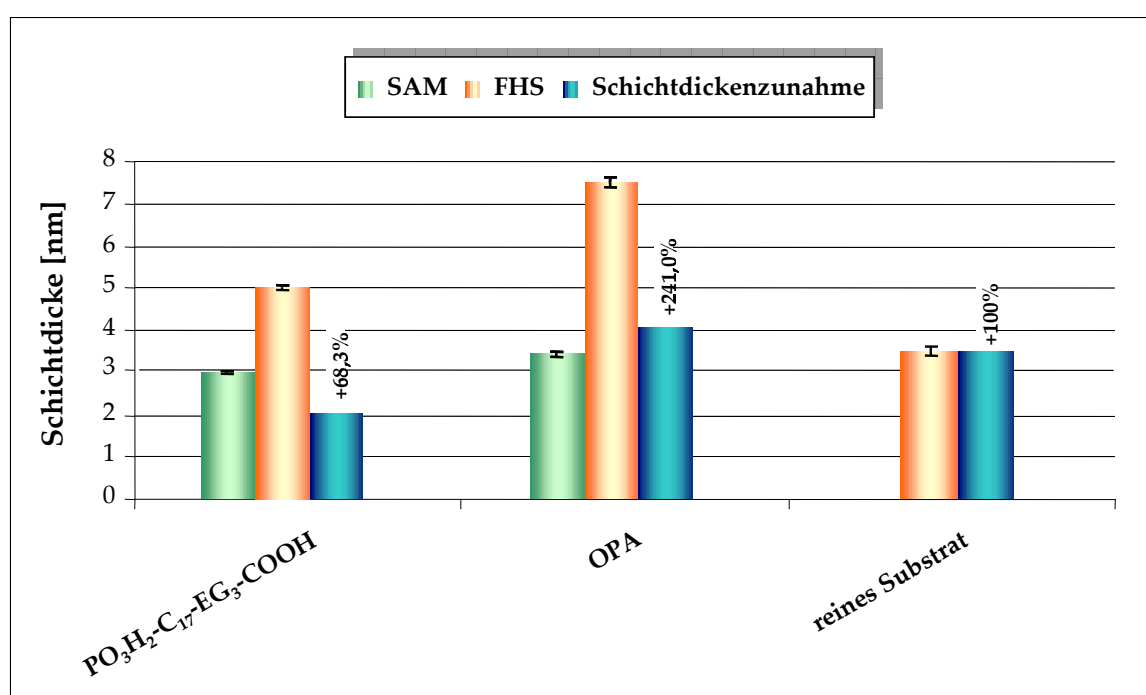


Abbildung 5-28: Verhalten der SAMs gegenüber FHS im Vergleich zum gereinigten, unmodifizierten Substrat.

5.5.1.2 Ergebnisse der in-situ Ellipsometrie

Die unspezifische Proteinadsorption von BSA konnte ebenfalls exemplarisch an den Monoschichten der Verbindungen **COOH-EG₃-C₁₇-PO₃H₂** und **OPA** auf TiO₂-Substraten mit Hilfe der in-situ-Ellipsometrie zeitabhängig untersucht werden. Die Durchführung dieser Versuche wurde im Kapitel 4.4.6.3 detailliert beschrieben und erfolgten jeweils als Doppelbestimmung.

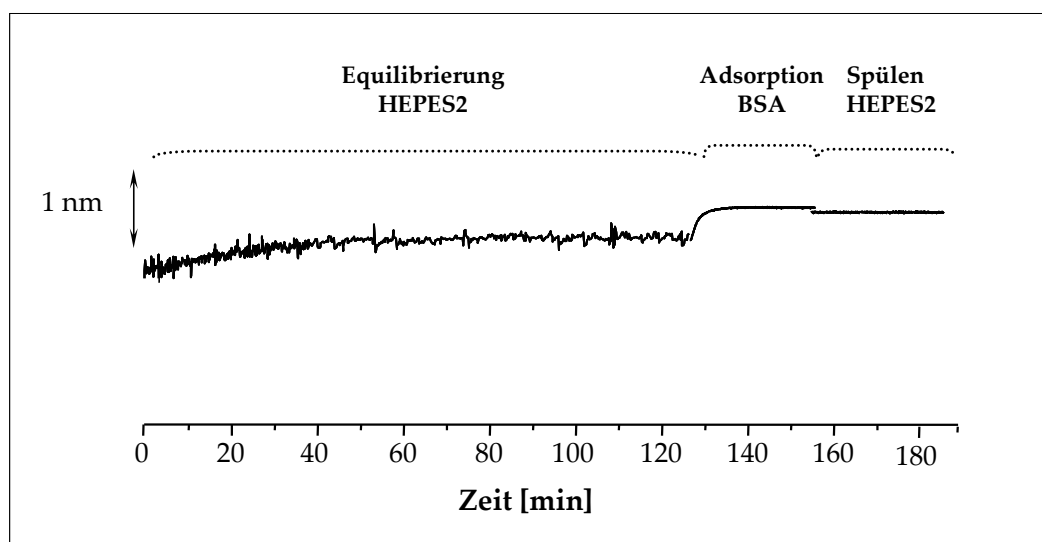


Abbildung 5-29: Verhalten der Monoschicht gegenüber BSA; zeitabhängige Adsorptionskurve.

In Abbildung 5-29 wurde zunächst ein Quellen der Schicht nach Zugabe der HEPES2-Pufferlösung sichtbar, welche dann nach 2h konstante Schichtdickenwerte annahm. Es erfolgte nun die Zugabe der BSA-Lösung und die damit verbundene unspezifische Anbindung der Proteine an die Monoschicht, erkennbar am Anstieg der Kurve. Zur Entfernung physisorbierter Moleküle wurde die Messzelle nach ca. 20min gründlich mit Pufferlösung gespült.

Es konnte eine Schichtdickenzunahme von 3,15 nm nachgewiesen werden, was nach DEFEIJTER (Gleichung 5-1) einer adsorbierten Proteinmenge von 0,77 mg/m² entsprach. Diese adsorbierte Menge war im Vergleich zu Literaturwerten von proteinaktiven Oberflächen relativ gering, deshalb kann von proteinabweisenden Oberflächen gesprochen werden. Die für die Berechnung erforderlichen Werte: der Brechungsindex der Proteinschicht $n=1,375$ sowie das Brechungsindexinkrement dn/dc für BSA mit 0,187 cm³/g wurden der Literatur [140] entnommen. Der Brechungsindex des Puffers $n=1,329$ wurde ellipsometrisch bestimmt.

Bei der SA-Schicht der Referenzsubstanz **OPA** war nach der BSA-Adsorption und anschließendem Spülen eine Schichtdickenzunahme von 11,02 nm zu verzeichnen, was nach DEFEIJTER einer adsorbierten Proteinmenge von 2,71 mg/m² entsprach. Bei dieser Schicht kann, wie erwartet, von einer proteinaktiven Oberfläche gesprochen werden. Zur Berechnung wurden die bereits angegebenen Werte verwendet.

5.5.1.3 Ergebnisse der SPR-Spektroskopie

Mit den zeitabhängigen SPR-Untersuchungen konnte das unspezifische Anbindungsverhalten der Proteine; BSA, Fibrinogen, Lysozym und Hämoglobin an die SA-Schichten der Verbindungen **COOH-EG₃-C₁₇-PO₄H₂**, **COOH-EG₃-C₁₇-PO₃H₂**, **NH₂-EG₃-C₁₇-PO₃H₂** und **OPA** beobachtet werden. Alle hier aufgeführten Proteine unterschieden sich in ihrer Größe und damit in ihrer Diffusionsgeschwindigkeit, einer unterschiedlich starken Substratbindung sowie dem IEP. Durch die Verwendung der verschiedenen Proteine sollte eine eventuelle Abhängigkeit zwischen den Eigenschaften und einer unspezifischen Proteinadsorption beobachtet werden. Alle Untersuchungen wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt.

Die SA-fähigen Moleküle wurden zunächst auf Au/Al₂O₃ bzw. Au/TiO₂-Oberflächen adsorbiert und nach einer Equilibrierung der Schichten in HEPES2-Puffer erfolgte die Zugabe der jeweiligen Proteinlösung für 20min. Die Proben wurden anschließend gründlich gespült.

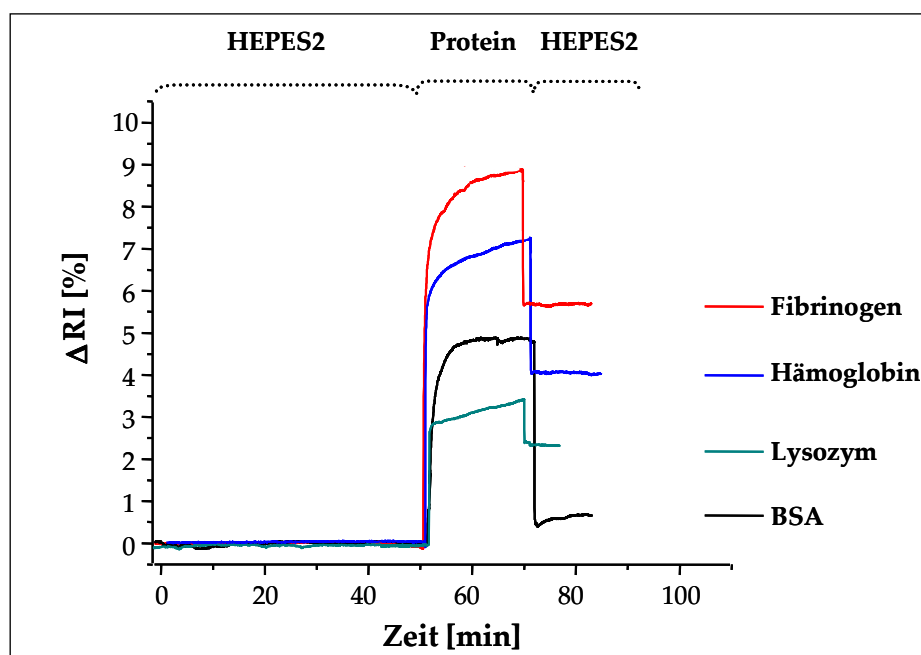


Abbildung 5-30: SPR-Sensogramm der Adsorption unterschiedlicher Proteine auf der SA-Schicht der Verbindung **COOH-EG₃-C₁₇-PO₃H₂** auf Au/Al₂O₃.

Abbildung 5-30 zeigt den zeitlichen Verlauf der unspezifischen Adsorption oben genannter Proteine für die SA-Schicht der Verbindung **COOH-EG₃-C₁₇-PO₃H₂** in Gegenwart von HEPES2-Pufferlösung. Der Kurvenverlauf ausgehend von HEPES2 stieg nach der Zugabe der Proteinlösung, aufgrund der Änderung der Konzentration, des Brechungsindex und ebenso der Größe der Proteine sehr steil an. Fibrinogen war das Protein mit der höchsten molaren Masse, das bei diesen Adsorptionsversuchen Verwendung fand und ist mit einem IEP von 5,7 im

verwendeten Puffersystem negativ geladen. Aufgrund der Größe sowie der Wechselwirkungen zum Substrat lieferte Fibrinogen den größten Intensitätssprung im Kurvenverlauf und ebenso die größte Schichtdickenzunahme (Winkeldifferenz: $0,8^\circ$) auf der Substratoberfläche. Der zweitgrößte Intensitätssprung im Kurvenverlauf war beim Hämoglobin zu verzeichnen, obwohl dieses Protein hinsichtlich der molaren Masse dem BSA sehr ähnelt. Der IEP dieses Protein lag bei 7,4, sodass im verwendeten Puffer ein neutral geladenes Molekül vorlag. Beim Vergleich der Lage der Minima aus den Scanmessungen resultierte eine Winkeldifferenz von $0,4^\circ$. Damit besaß Hämoglobin die zweitgrößte Affinität zur Substratoberfläche im Vergleich zum Anbindungsverhalten der anderen Proteine. Lysozym, das kleinste Protein mit einem IEP bei 11, lag positiv geladen vor und erreichte aufgrund der Wechselwirkungen mit der SA-Schicht die drittgrößte Zunahme der Schichtdicke (Winkeldifferenz: $0,35^\circ$). Der Grund dafür lag in den Coulombschen sowie ionischen Wechselwirkungen, die zwischen den Proteinen und den COOH/COO^- Gruppen herrschten. Das BSA-Molekül reagierte nur im geringen Maße mit der modifizierten Oberfläche und ließ sich im Vergleich zu den anderen Proteinen beim Spülen von den carboxylterminierten Schichten sehr gut wieder entfernen, was auch die Winkeldifferenz von $0,25^\circ$ zeigte. Eine höhere Differenz trat bei der aminoterminierten Verbindung aufgrund von ionischen Wechselwirkungen zwischen den negativ geladenen BSA-Molekülen und den $\text{NH}_2/\text{NH}_3^+$ Gruppen auf.

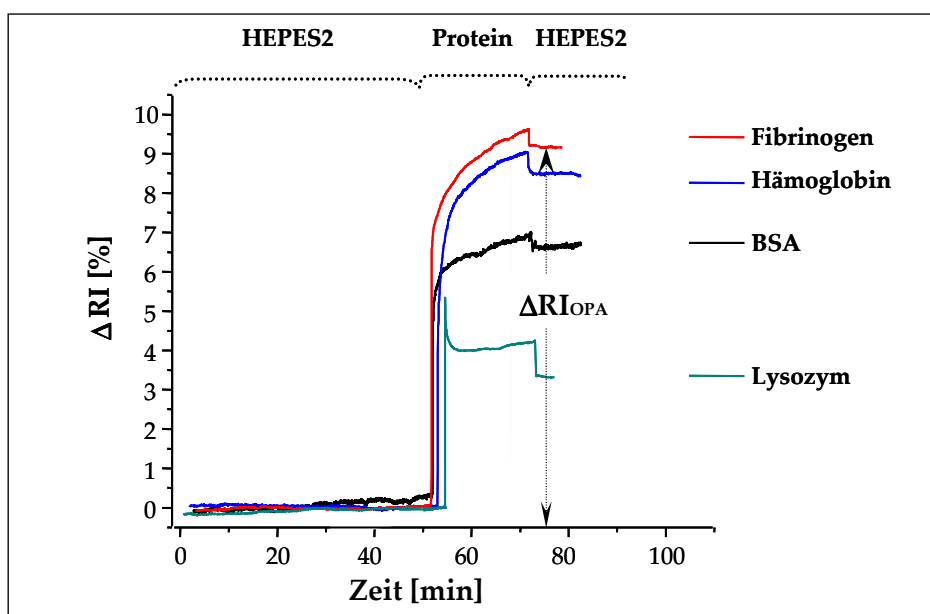


Abbildung 5-31: SPR-Sensogramm von der Adsorption unterschiedlicher Proteine auf der SA-Schicht der Verbindung OPA auf Au/Al₂O₃.

Zum Vergleich wurden analoge Messungen an **OPA** funktionalisierten Oberflächen durchgeführt, wobei ein ähnliches Sensogramm (Abbildung 5-31) wie für die **COOH-EG₃-C₁₇-PO₃H₂** modifizierten Oberflächen erhalten wurde. Der einzige Unterschied basiert auf der adsorbierten Menge an Proteinen. Aufgrund der hydrophoben Oberfläche fanden an der **OPA**-Schicht stärkere Adsorptionen als an den Tri(ethylenglykol)-modifizierten Schichten statt. Die Differenzen zwischen der Lage der Minima, die aus den Scanmessungen vor und nach der Proteinadsorption gegen Wasser resultierten, wurden von allen Verbindungen in der nachfolgenden Tabelle zusammengestellt.

Neben den Untersuchungen zum Verhalten verschiedener Proteine gegenüber modifizierten Oberflächen wurden auch die reinen unbehandelten Substrate getestet. Dabei stellte sich heraus, dass eine sehr hohe Affinität des BSA-Moleküls zur Al₂O₃-Oberfläche bestand. Aluminiumoxid hat seinen IEP bei etwa 9. Da beim physiologischen pH-Wert gearbeitet wurde, war die Oberfläche positiv geladen. Aufgrund der negativen Ladung des BSA-Moleküls bei diesem pH-Wert konnte dieses bevorzugt durch ionische Wechselwirkungen an der Al₂O₃-Oberfläche anbinden. Da die TiO₂-Oberfläche bei pH 7,4 negativ geladen vorlag, adsorbierten weniger Proteinmoleküle.

Tabelle 5-13: Gegenüberstellung der Winkeldifferenzen zwischen den Minima vor und nach der Proteinadsorption aus der scan-Messung

Verbindung	Winkeldifferenz $\Delta\theta$ [°]			
	Fibrinogen	Hämoglobin	BSA	Lysozym
COOH-EG₃-C₁₇-PO₃H₂	0,75	0,40	0,20	0,25
COOH-EG₃-C₁₇-PO₃H₂	0,80	0,40	0,25	0,35
NH₂-EG₃-C₁₇-PO₃H₂	0,70	0,35	0,30	0,10
OPA	1,0	0,90	1,0	0,80
reines Substrat (Au/Al₂O₃)	-	-	0,65	-
reines Substrat (Au/TiO₂)	-	-	0,30	-

Des Weiteren konnten aus den Daten der SPR-Spektroskopie die Mengen an adsorbierten Proteinen relativ zur hydrophoben Oberfläche der Referenzsubstanz **OPA** berechnet werden. Auf der Grundlage dieser Berechnung ließ sich die proteinresistente Wirkung des Ethylenglykolanteils in Abhängigkeit der Kettenlänge sowie hinsichtlich der Variation der

Proteine gut erkennen. Die SA-Schicht der Verbindung **OPA** wurde diesen Berechnungen zugrunde gelegt, weil sie sich durch die hohe Packungsdichte der Moleküle auf der Oberfläche und einen starken hydrophoben Charakter sehr gut als Referenz eignete. Hydrophobe SA-Schichten sind dafür bekannt, große Mengen an Proteinen unspezifisch zu adsorbieren [46, 112].

Die relative Menge an adsorbierten Protein (PA) konnte aus den ΔRI -Werten, welche aus den SPR-Sensogrammen hervorgingen, über die folgende Gleichung ermittelt werden [46]:

Gleichung 5-3:

$$\%PA = \Delta RI \cdot (\Delta RI_{OPA})^{-1} \cdot 100$$

%PA: Menge an adsorbierten Protein; ΔRI : Änderung der reflektierten Intensität; ΔRI_{OPA} : Änderung der reflektierten Intensität bezogen auf **OPA**

Die Berechnung der relativen adsorbierten Menge erfolgte für die Proteine Fibrinogen, Hämoglobin, BSA und Lysozym. Die ΔRI -Werte der Verbindung ermittelten sich aus der Differenz zwischen der reflektierten Intensität vor und nach der Proteinadsorption aus der jeweiligen Kinetikkurve (speziell für die Verbindung **OPA**, siehe Abbildung 5-31).

Tabelle 5-14: Berechnete Menge an unspezifisch adsorbierten Proteinen

Verbindung	Fibrinogen	Hämoglobin	BSA	Lysozym
ΔRI_{OPA} [%]				
OPA	12,40	6,86	5,02	3,62
PA [%]				
OPA	100,0	100,0	100,0	100,0
COOH-EG₃-C₁₇-PO₄H₂	58,2	44,4	12,8	21,0
COOH-EG₃-C₁₇-PO₃H₂	67,3	53,7	18,7	26,6
NH₂-EG₃-C₁₇-PO₃H₂	48,2	33,9	22,2	10,9
HEG-OOC-C₁₇-PO₃H₂	18,5	13,8	0,5	6,8
HPG-OOC-C₁₇-PO₃H₂	0	0	0	0
reines Substrat (Au/Al₂O₃)	-	-	59,6	-
reines Substrat (Au/TiO₂)	-	-	44,7	-

Die relativen Mengen an adsorbierten Proteinen korrelieren sehr gut mit den bestimmten Winkeldifferenzen aus der Scanmessung. Es wurde eine sehr hohe Adsorptionsmenge an Fibrinogen festgestellt. Dieses Protein besitzt eine hohe molare Masse und adsorbiert an den meisten Oberflächen sehr gut. Ebenso wurden beachtliche Mengen an Hämoglobin auf den SA-Schichten immobilisiert. Lysozym und BSA wurden, aufgrund von Coulombschen und ionischen Wechselwirkungen zwischen Proteinen und den terminalen funktionellen Gruppen der Schichten nur in geringen Mengen adsorbiert.

Aus den durchgeführten Untersuchungen ging hervor, dass aufgrund ihrer Tertiärstruktur, alle getesteten Proteine eine hohe Affinität zu der hydrophoben Monoschicht der Verbindung **OPA** zeigten. Eine unspezifische Proteinadsorption konnte bei den Monoschichten der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen im Vergleich zu **OPA** aufgrund der Tri(ethylenglykol)-Einheit erfolgreich zurückgedrängt, aber nicht komplett verhindert werden. Aufgrund der funktionellen Gruppen war hier eine Anbindung der Proteine, vermutlich über die Ausbildung von Peptidbindungen sowie durch ionische Wechselwirkungen möglich. Die Ergebnisse der in-situ-Ellipsometrie zeigten, dass die Proteine eine geringe Affinität gegenüber Tri(ethylenglykol)-terminierten SAMs besaßen. Um eine Proteinresistenz zu erzielen, wurden eine Verlängerung der Tri(ethylenglykol)-Kette zum Hexa(ethylenglykol) sowie eine Erhöhung des Verzweigungsgrades des linearen Ethylenglykols zum Polyglycidol vorgenommen. Die Ergebnisse sind im nachfolgenden Kapitel detailliert beschrieben.

Im Allgemeinen lässt sich über die Art der Anbindung von Proteinen an einer Oberfläche keine konkrete Aussage treffen, sondern nur Vermutungen anstellen, da bis heute diese Prozesse noch nicht vollständig erforscht sind. Des Weiteren blieb auch die Frage ungeklärt, in welcher Form die gebundenen Moleküle auf der Oberfläche vorlagen, ob sie noch biologisch aktiv oder bereits denaturiert waren.

5.5.1.4 Ergebnisse der Oberflächenreaktionen

In diesem Kapitel sollen die Ergebnisse der Einführung von Hexa(ethylenglykol) (HEG) und hochverzweigtem Polyglycidol (HPG) an die Monoschicht der Verbindung **COOH-C₁₇-PO₃H₂** dargestellt werden. Diese Anbindungen dienten der Untersuchung des Einflusses der Kettenlänge sowie des Verzweigungsgrades der Ethylenglykoleinheit auf die Proteinresistenz. Eine detaillierte Beschreibung der Oberflächenreaktionen erfolgte in Kapitel 3.8.3. Die

resultierenden Schichten wurden mit der SPR-Spektroskopie und XPS charakterisiert. Die Untersuchungen wurden als Vierfachbestimmungen durchgeführt.

Bei allen Versuchen war es zunächst erforderlich, die Verbindung **COOH-C₁₇-PO₃H₂** erfolgreich auf Substratoberflächen zu adsorbieren. Dafür wurden für die SPR-Untersuchungen Au/TiO₂-Oberflächen und für die XPS TiO₂-Wafer verwendet.

Mit Hilfe von winkelabhängigen XPS-Untersuchungen konnte zunächst die erfolgreiche Anbindung und richtige Orientierung der Verbindung **COOH-C₁₇-PO₃H₂** auf TiO₂-Substraten nachgewiesen werden.

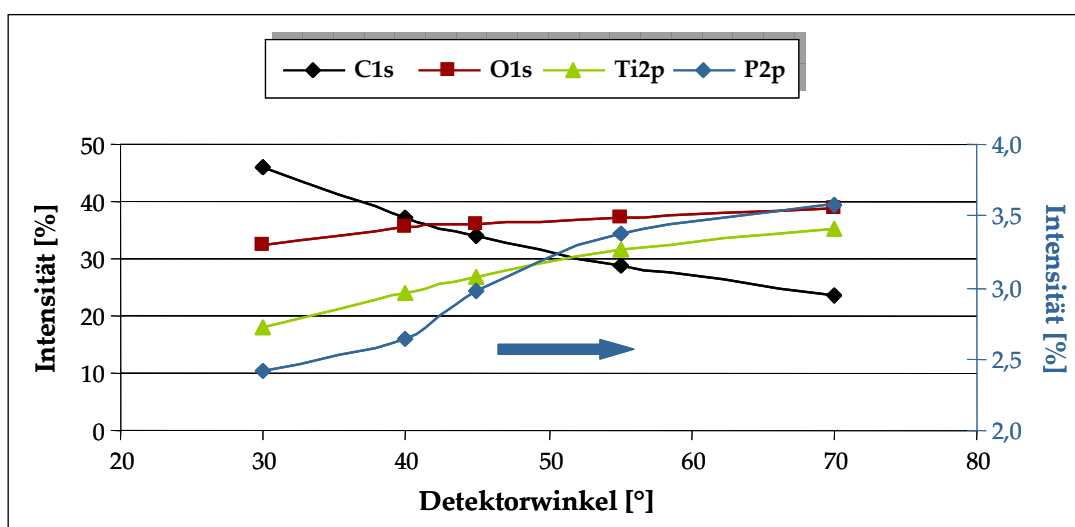


Abbildung 5-32: Winkelabhängige XPS-Messung; Elementintensität innerhalb der Monoschicht der Verbindung **COOH-C₁₇-PO₃H₂** in Abhängigkeit vom Detektorwinkel.

Die Abnahme der Kohlenstoffintensität und die Zunahme der Intensität der Elemente Ti, P und O mit steigendem Detektorwinkel zur Oberfläche bewiesen die richtige Orientierung der Moleküle auf der Oberfläche. Ebenfalls korrelierten die experimentell ermittelten Werte für die Atomkonzentrationen der in der Monoschicht enthaltenen Elemente sehr gut mit den theoretischen Werten (C: 72,2 Atom% (73,1 Atom%); O: 23,5 Atom% (23,1 Atom%); P: 3,8 Atom% (3,8 Atom%)).

Die nachfolgende Abbildung zeigt den Adsorptionsverlauf der Verbindung **COOH-C₁₇-PO₃H₂** im Rahmen einer SPR-Kinetikmessung. Anhand des einsetzenden Plateau nach ca. 750min und dem nur minimalen Abfall der Kurve nach dem Spülen konnte man von einer erfolgreichen Ausbildung einer SA-Monoschicht ausgehen, die die Grundlage zur Anbindung von HEG und HPG bildete.

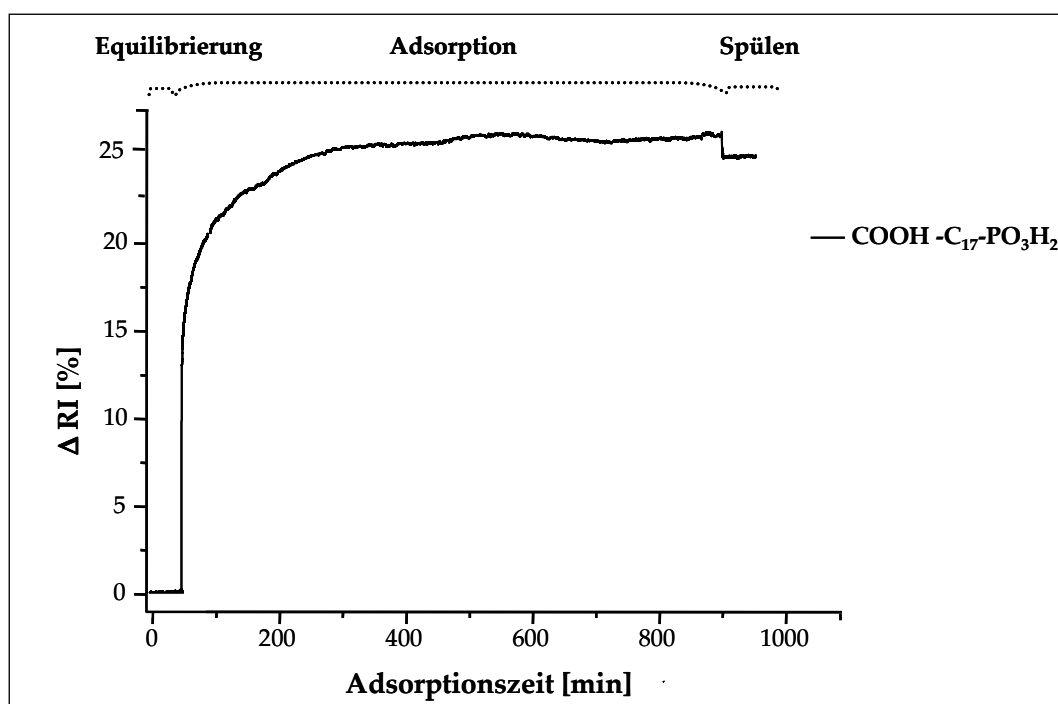


Abbildung 5-33: SPR-Sensogramm von der Adsorption der Verbindung $\text{COOH-C}_{17}\text{-PO}_3\text{H}_2$ auf Au/TiO_2 .

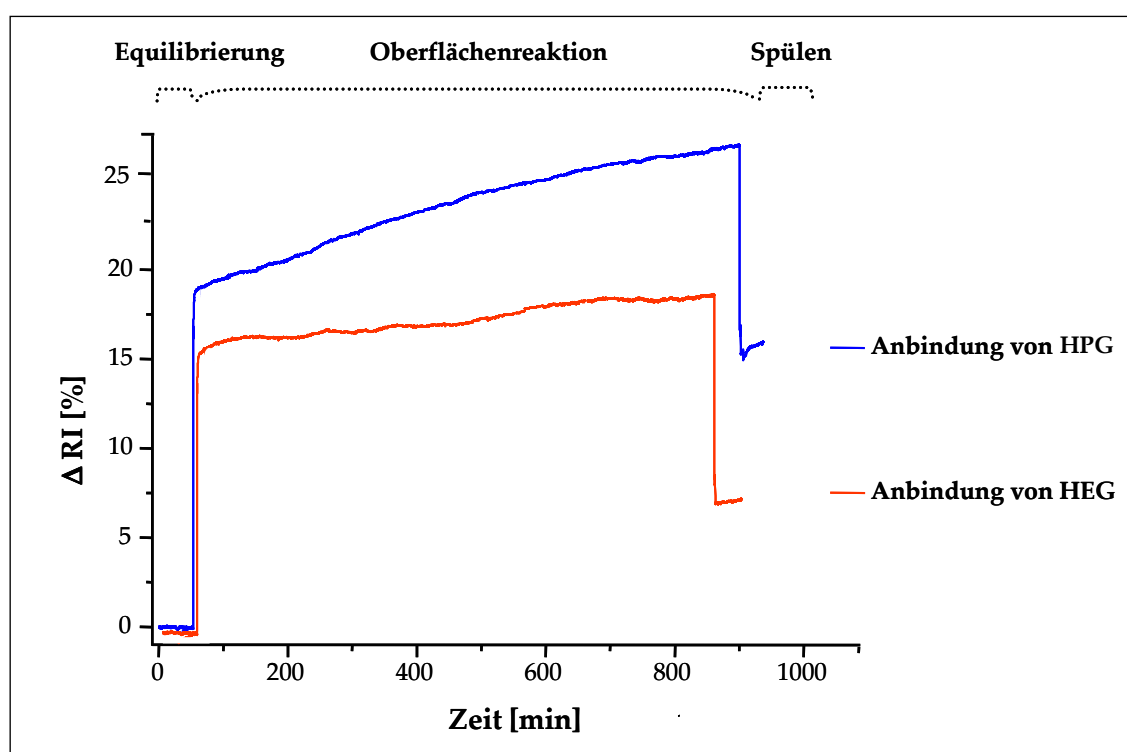


Abbildung 5-34: SPR-Sensogramm von der Anbindung von HPG und HEG an die SA-Schicht der Verbindung $\text{COOH-C}_{17}\text{-PO}_3\text{H}_2$ auf Au/TiO_2 .

An den hergestellten Monoschichten wurden im Anschluss Oberflächenreaktionen in DMF zur Einführung der Ethylenglykol-Spezies durchgeführt (Abbildung 5-34). Dabei wurde das modifizierte Substrat zunächst 1h in trockenen DMF equilibriert und anschließend die

jeweiligen Reaktionsmischungen für 24h zugesetzt. Nach der Zugabe der einzelnen Edukte war zunächst ein steiler Anstieg im Kurvenverlauf aufgrund Konzentrations- und Brechungsindexunterschiede sichtbar, dem sich ein langsamer, stetiger Anstieg anschloss, der einer Ankopplung der Ethylenglykol-Spezies an die Monoschicht und damit einer Zunahme der Schichtdicke entsprach. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde die Messzelle sehr gründlich mit DMF gespült. Da die Kurven nicht wieder auf das Ausgangsniveau zurück sanken, sondern deutlich über diesem lagen, konnte von einer erfolgreichen Anbindung ausgegangen werden. Anhand des Kurvenverlaufes konnte festgestellt werden, dass die HPG-modifizierte Schicht aufgrund des stark verzweigten, voluminösen Moleküls HPG eine höhere Schichtdicke (Winkeldifferenz: $3,9^\circ$) besaß als die HEG-Spezies (Winkeldifferenz: $0,35^\circ$). Die angegebenen Winkeldifferenzen gingen aus der Lage der Minima der Spektren aus den winkelabhängigen SPR-Messungen hervor, die vor und nach der Adsorption durchgeführt wurden. Die so modifizierten Schichten stellten nun die Voraussetzung für neue Proteinversuche in HEPES2-Puffer dar.

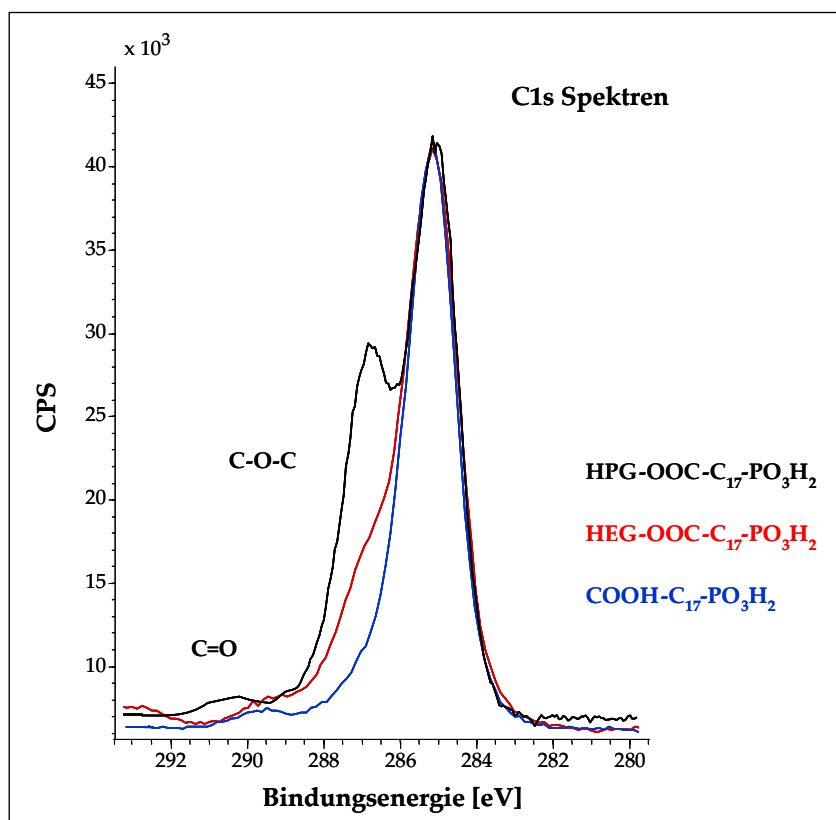


Abbildung 5-35: Gegenüberstellung von C1s-Detailspektren der Monoschichten **HPG-C₁₇-PO₃H₂**, **HEG-C₁₇-PO₃H₂** und **COOH-C₁₇-PO₃H₂**.

Einen weiteren Nachweis zur erfolgreichen Anbindung von HPG und HEG an die Monoschicht der Verbindung $\text{COOH-C}_{17}\text{-PO}_3\text{H}_2$ lieferte die Gegenüberstellung der C1s-Detailspektren aus der XPS Messungen (Abbildung 5-35). Beim Vergleich dieser Spektren fiel eine Steigerung der Intensität der C-O-C-Molekülgruppe ausgehend von der unmodifizierten Monoschicht über die HEG-terminierte bis hin zur HPG-terminierten Schicht auf, wobei die zuletzt genannte Intensität mit der der Tri(ethylenglykol)-Spezies korrelierte (Vergleich Abbildung 5-15). Ein Grund dafür lag in der geringen Konzentration von HEG bzw. HPG auf der SA-Schicht. Aus den Spektren ging hervor, dass nicht jede verfügbare Carboxylgruppe tatsächlich mit den Ethylenglykolspezies reagiert hat, da noch freie Säuregruppen nachzuweisen waren. Des Weiteren handelte es sich bei HPG um ein sehr voluminöses Molekül, so dass die geringe Konzentration auf der Oberfläche auf einen erhöhten Platzbedarf zurückzuführen war. Bei Hexa(ethylenglykol) kann man die geringe Zahl gebundener Moleküle mit den zwei reaktiven Hydroxygruppen begründen, die auf der Monoschicht gleichzeitig reagiert haben können und somit eine Art Loop ausbildeten. Aber trotz der geringen Intensität der Ethylenglykol-Spezies auf der Monoschicht konnte eine unspezifische Proteinanbindung völlig unterdrückt bzw. stark zurückgedrängt werden (Vergleich Abbildung 5-36 und Tabelle 5-14).

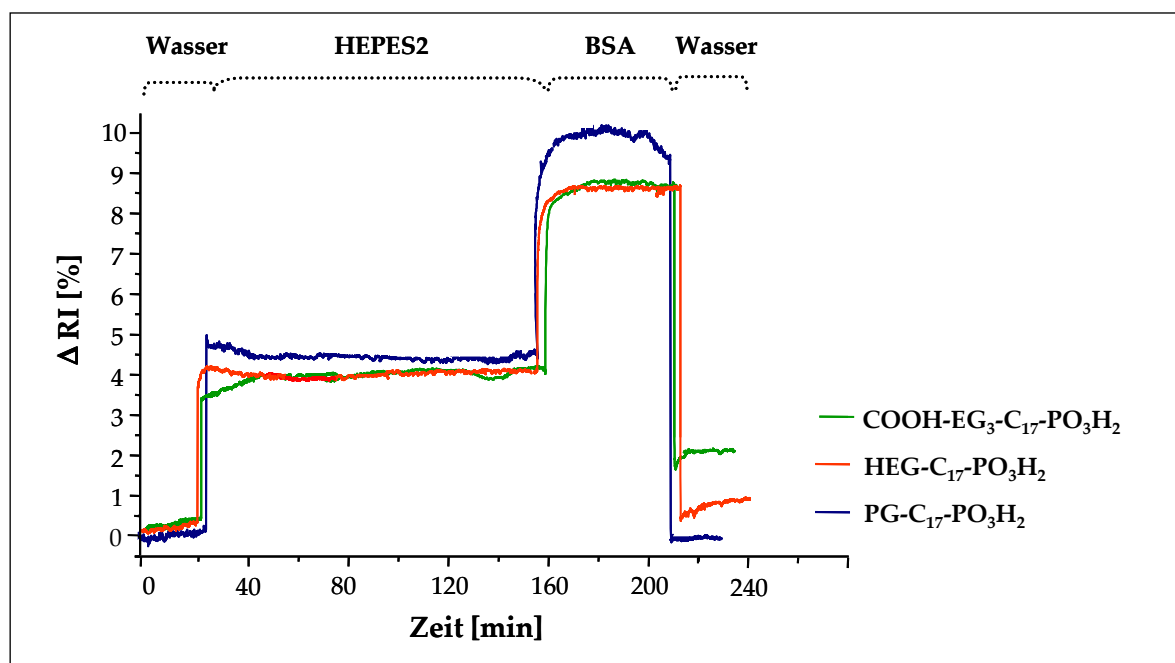


Abbildung 5-36: SPR-Sensogramm zeigt die Stabilität der erzeugten Schichten in HEPES2 sowie das Adsorptionsverhalten der Schichten gegenüber BSA auf Au/TiO₂.

In Abbildung 5-36 ist die Adsorption von BSA an drei verschiedenen Monoschichten der Verbindungen $\text{COOH-EG}_3\text{-C}_{17}\text{-PO}_3\text{H}_2$, $\text{HPG-C}_{17}\text{-PO}_3\text{H}_2$ und $\text{HEG-C}_{17}\text{-PO}_3\text{H}_2$ dargestellt.

Zunächst wurden alle drei Schichten auf ihr Stabilitätsverhalten gegenüber HEPES2-Puffer geprüft. Anhand der Kurvenverläufe ließ sich erkennen, dass alle Schichten stabil blieben. Aufgrund dieser Beobachtung wurden sie anschließend 20min mit BSA-Lösung versetzt. Nach einem gründlichen Spülen mit Wasser zeigte sich, dass sich die Schichtdicke der Tri(ethylenglykol)-Spezies erhöht hatte, da die Kurve nicht wieder auf das Ausgangsniveau zurückkehrte und somit im Vergleich zu den anderen Verbindungen die größte Menge an BSA-Molekülen (18,7% in Bezug auf **OPA**) adsorbiert hat. Die Schicht der HEG-Verbindung zeigte ein annähernd proteinresistentes Verhalten aufgrund der Kurvenlage nach dem Spülen im Bezug zum Ausgangsniveau. Es wurde eine Proteinmenge von 2% in Bezug auf **OPA** adsorbiert. Eine proteinresistente Schicht gegenüber den BSA-Molekülen (adsorbierte Menge 0%) wurde durch die Anbindung des HPG gebildet, die nach dem Spülen auf das Ausgangsniveau der Kurve zurück fiel. Die Differenzen zwischen der Lage der Minima vor und nach dem Adsorptionsversuch bestätigten nochmals die Ergebnisse der Kinetikmessungen: TEG-Schicht: $\Delta\theta = 0,25^\circ$; HEG-Schicht: $\Delta\theta = 0,1^\circ$ und HPG-Schicht: $\Delta\theta = 0,0^\circ$.

Ebenso zeigten die HPG-modifizierten Schichten ein resistentes Verhalten gegenüber den Proteinen Lysozym, Fibrinogen und Hämoglobin auf. Nach der Adsorption des jeweiligen Proteins wurde die Schicht mit Wasser gespült, die Kurve sank danach auf ihr Ausgangsniveau zurück, was für eine erfolgreiche Verhinderung der Proteinanbindung stand. Kein proteinresistentes Verhalten, aber eine deutliche Verminderung der Anbindung von den oben genannten Proteinen im Vergleich zur Tri(ethylenglykol)-Spezies, zeigten die HEG-terminierten Schichten.

Aus diesen Beobachtungen ging hervor, wie auch in der Literatur sehr oft beschrieben wurde, dass mit einer Erhöhung und zunehmender Verzweigung des Ethylenglykolanteils gleichzeitig die Resistenz gegenüber einer unspezifischen Proteinanbindung stieg.

5.5.2 Spezifische Proteinadsorption

Um Untersuchungen zur spezifischen Proteinanbindung durchführen zu können, erwies es sich zunächst als notwendig, die Monoschicht der Verbindung **COOH-EG₃-C₁₇-PO₃H₂** durch eine Oberflächenreaktion zu aktivieren. An diese modifizierte Oberfläche wurde anschließend Poly-L-Lysin (PLL) spezifisch über die Ausbildung einer Peptidbindung immobilisiert. Eine ebenfalls

spezifische Anbindung über nicht kovalente Wechselwirkungen war zwischen Streptavidin und Biotin möglich. Biotin wurde vorher durch eine Oberflächenreaktion an die Monoschicht der Verbindung $\text{NH}_2\text{-EG}_3\text{-C}_{17}\text{-PO}_3\text{H}_2$ kovalent angebunden. Die Durchführung der jeweiligen Oberflächenreaktionen wurde detailliert im Kapitel 3.8.1 bzw. 3.8.2 beschrieben. Diese Untersuchungen wurden als Vierfachbestimmungen durchgeführt und mittels der SPR-Spektroskopie verfolgt. Die resultierenden Oberflächen wurden mit XPS charakterisiert.

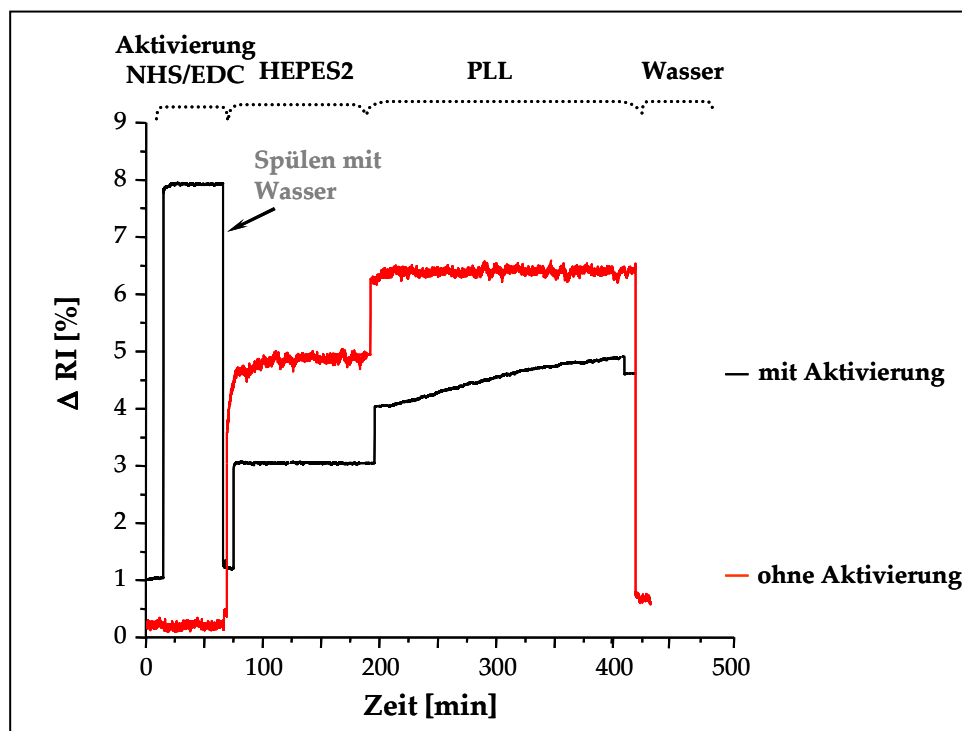


Abbildung 5-37: SPR-Sensogramm zeigt die spezifische Anbindung von PLL an die aktivierte und nicht aktivierte Monoschicht der Verbindung $\text{COOH-EG}_3\text{-C}_{17}\text{-PO}_3\text{H}_2$ auf Au/TiO_2 .

Die aktivierte Monoschicht der Verbindung $\text{COOH-EG}_3\text{-C}_{17}\text{-PO}_3\text{H}_2$ zeigte zunächst ein stabiles Verhalten gegenüber HEPES2-Puffer und nach Zugabe der PLL-Lösung war ein stetiger, deutlicher Anstieg im Kurvenverlauf zu verzeichnen, was für die spezifische Anbindung von PLL sprach (Abbildung 5-37). Nach dem Spülen der Proteinlösung aus der Messzelle ließ sich ein sehr geringer Abfall der Kurve beobachten, was ebenfalls eine erfolgreiche Immobilisierung des Proteins bestätigte. Im Gegensatz dazu stand der Versuch der spezifischen Anbindung von PLL an eine unaktivierte Monoschicht. Hier fiel die Kurve nach dem Ausspülen der Proteinlösung bis annähernd zum Ausgangsniveau zurück, was auf eine geringe Immobilisierung hindeutete. Diese Ergebnisse konnten auch mit der winkelabhängigen SPR-Messung vor und nach der Adsorption bestätigt werden. Dabei lag die Winkeldifferenz für die aktivierte Schicht bei $\Delta\theta=0,35^\circ$ und die für die unaktivierte Schicht bei $\Delta\theta=0,1^\circ$.

Die erfolgreiche Anbindung des Biotinmoleküls an die Monoschicht der Verbindung $\text{NH}_2\text{-EG}_3\text{-C}_{17}\text{-PO}_3\text{H}_2$ konnte mit der Immobilisierung von Streptavidin getestet werden. Das tetramere Protein Streptavidin besitzt eine sehr hohe Affinität zu Biotin und kann spezifisch durch starke nicht kovalente Wechselwirkungen vier dieser Moleküle binden.

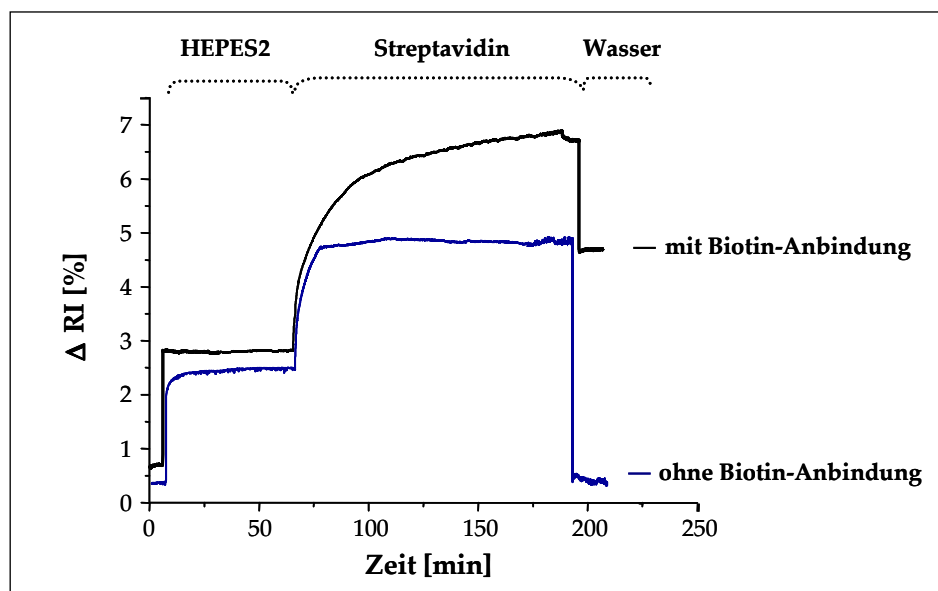


Abbildung 5-38: SPR-Sensogramm zeigt die spezifische Anbindung von Streptavidin an die unmodifizierte und biotinmodifizierte Monoschicht der Verbindung $\text{NH}_2\text{-EG}_3\text{-C}_{17}\text{-PO}_3\text{H}_2$ auf Au/TiO_2 .

Abbildung 5-38 zeigt, dass eine erfolgreiche Immobilisierung von Streptavidin an der biotinmodifizierten Oberfläche stattgefunden hat, da nach der Zugabe der Proteinlösung die Kurve stetig stieg und sie nach dem Spülen der Messzelle nicht auf das Ausgangsniveau zurückfiel. Bei der unmodifizierten Oberfläche war keine spezifische Anbindung von Streptavidin zu verzeichnen, da zum Einen kurz nach Zugabe der Proteinlösung ein Plateau erreicht wurde und zum Anderen nach dem Spülen die Kurve auf ihr Ausgangsniveau zurück sank. Auch die Winkeldifferenzen der Minima vor und nach der Adsorption aus der scan-Messung bestätigten diese Beobachtung. Das Minimum der biotinmodifizierten Probe verschob sich um $0,45^\circ$ und das der unmodifizierten Probe um $0,0^\circ$.

Des Weiteren konnte eine erfolgreiche Anbindung von Biotin an die Monoschicht der Verbindung $\text{NH}_2\text{-EG}_3\text{-C}_{17}\text{-PO}_3\text{H}_2$ mit Hilfe der hochaufgelösten sowie winkelabhängigen XPS bewiesen werden. Durch die Einführung des Biotinmoleküls lag neben dem Stickstoffatom ein weiteres Markeratom, der Schwefel, vor, mit dessen Hilfe sehr leicht Aussagen über die Orientierung der Moleküle auf der TiO_2 -Oberfläche getroffen werden konnten.

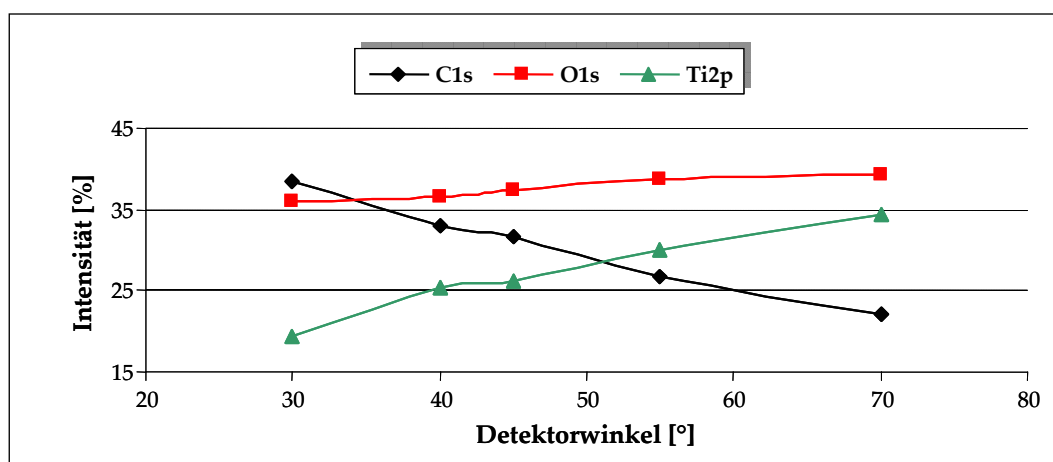


Abbildung 5-39: Intensitäten der Elemente C, O und Ti innerhalb der biotinterminierten Monoschicht in Abhängigkeit vom Detektorwinkel zur Oberfläche.

In Abbildung 5-39 sind die Intensitäten der Elemente C, O und Ti innerhalb der biotinterminierten Monoschicht in Abhängigkeit vom Detektorwinkel dargestellt. Es war deutlich ein Anstieg der Intensitäten des O-Signals aufgrund der Zunahme der TiO_2 -Intensität und des Ti-Signals mit abnehmender Entfernung zur Oberfläche mit zunehmendem Detektorwinkel zu beobachten. Die Intensität des C-Signals stieg mit zunehmender Entfernung von der Oberfläche.

Aus Abbildung 5-40 geht hervor, dass sich die Phosphonsäuregruppe unmittelbar an der TiO_2 -Oberfläche befand. Die Signale von N und S stiegen mit zunehmender Entfernung von der Oberfläche mit abnehmenden Detektorwinkel an, was die erfolgreiche Anbindung von Biotin an die aminoterminierte Monoschicht bestätigte.

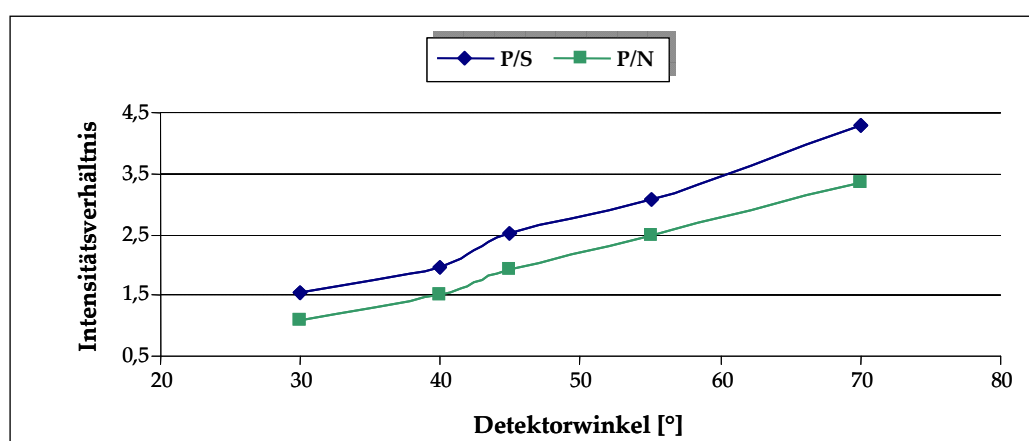


Abbildung 5-40: Intensitätsverhältnisse der Elemente P/S und P/N innerhalb der biotinterminierten Monoschicht in Abhängigkeit vom Detektorwinkel zur Oberfläche.

Tabelle 5-15: XPS-Bindungsenergien ($\pm 0,1$ eV) von SA-Schichten adsorbiert auf TiO₂ Oberflächen, Referenz: C1s Peak bei 285,0 eV.

Element	Molekülgruppe	Bindungsenergie [eV]		
		COOH-EG ₃ -C ₁₇ -PO ₃ H ₂	NH ₂ -EG ₃ -C ₁₇ -PO ₃ H ₂	Biotin- NH-EG ₃ -C ₁₁ -PO ₃ H ₂
C1s (1)	CH ₂	285,0	285,0	285,0
C1s (2)	C-O-P, C-O, C-P	286,7	286,7	286,6
C1s (3)	C=O, CO-O bzw. C-N, C-S	289,5	288,4	288,7
N1s	NH ₂	-	400,1	400,4
S2p	C-S-C	-	-	167,2
O1s (1)	TiO ₂	530,1	530,1	530,1
O1s (2)	Ti-O-P	531,4	531,3	531,3
O1s (3)	P-O-C, C-O-C, P=O	532,8	532,4	532,4
O1s (4)	P-OH	533,5	533,2	533,2
P2p ^{1/2}		134,3	134,3	143,3
P2p ^{3/2}	C-(O)-P(=O)(O) ₂	133,5	133,7	133,7
Ti2p	TiO ₂	459,2	459,2	459,2

In Tabelle 5-15 sind die zu den Molekülgruppen zugeordneten Bindungsenergien der Monoschichten der Verbindungen COOH-EG₃-C₁₇-PO₃H₂, NH₂-EG₃-C₁₇-PO₃H₂ und der biotinterminierte Schicht gegenübergestellt. Diese korrelierten sehr gut, mit Ausnahme der Bindungsenergie der biotinilierten Schicht bei 288,7 eV. Dieser Wert lag zwischen den Bindungsenergien der carboxyl- und der aminoterminierten Schichten, was auf eine gebildete Peptidbindung als auch auf C-N- und C-S-Bindungen zurückzuführen war. Demzufolge hat eine erfolgreiche Anbindung von Biotin an die aminoterminierte Monoschicht stattgefunden.

Die Untersuchungen zeigten eine erfolgreiche spezifische Immobilisierung von Poly-L-Lysin an die aktivierte Monoschicht der carboxylterminierten Spezies sowie von Streptavidin an die biotinilierte SA-Schicht der aminoterminierte Verbindung.

6. Zusammenfassung

Die Immobilisierung von Oligo- oder Poly(ethylenglykol)-derivaten an Oberflächen von Metallen ist ein viel genutzter Ansatz, um unspezifische Adsorptionen von Biomolekülen, wie Bakterien, Zellen und Proteinen zu minimieren bzw. zu verhindern.

Im Mittelpunkt der Arbeit stand die Entwicklung, Darstellung, Charakterisierung sowie Applikation maßgeschneiderter, SA-fähiger Moleküle, die gezielt auf TiO₂- und nicht auf SiO₂-Oberflächen anbinden konnten. Die resultierenden Monoschichten (SAMs) sollten eine Biokompatibilität sowie Biofunktionalität aufweisen.

Die Arbeit konnte in vier Teile untergliedert werden: 1. Synthese und Charakterisierung der neuen Verbindungen; 2. Adsorption und Charakterisierung der Monoschicht auf metalloxidischen Oberflächen; 3. Stabilitätsverhalten der adsorbierten Spezies gegenüber Puffersystemen; 4. Verhalten der Monoschichten gegenüber unspezifischer und spezifischer Proteinadsorption.

Es wurden bisher neue noch nicht beschriebene Moleküle entwickelt, die auf einer Kombination von funktionalisierten Oligo(ethylenglykol)-einheiten mit Monoalkylphosphorsäure- und Alkylphosphonsäurederivaten basieren. Die entwickelten Moleküle sind generell in vier unterschiedlich funktionelle Teile untergliedert: die Phosphat- bzw. Phosphonatgruppe als oberflächenaktive Kopfgruppe zur kovalenten Anbindung der Moleküle an Titandioxidoberflächen; den Alkylspacer, der aufgrund der Van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen den hydrophoben Alkylketten die Ordnung der Moleküle bewirkt; die Oligo(ethylenglykol)-einheit, zur Resistenz gegenüber unspezifischer Proteinadsorption; und die terminale funktionelle Gruppe, welche als Linker für die Anbindung spezifischer Bioliganden fungiert. Die Darstellung dieser Moleküle erfolgte aus in der Literatur bereits bekannten Synthesestufen. Eine neue Kombination dieser Reaktionen sowie die Variation der Reaktionsparameter führten zu neuen, in der Literatur noch nicht

beschriebenen Verbindungen. Insgesamt war die Darstellung der sechs neuen carboxyl- und aminoterminierten Tri(ethylenglykol)-alkylphosphorsäure- und -phosphonsäurederivate sowie der carboxylterminierten Alkylphosphonsäure erfolgreich. Die Durchführung der Synthesen erfolgte unter Argonatmosphäre und unter Ausschluss von Feuchtigkeit. Es konnten hohe Ausbeuten (70-90%) und die entsprechenden spektroskopischen Reinheitsgrade erzielt werden. Die Verbindungen wurden mit den gängigen analytischen Methoden, wie NMR, IR und Elementaranalyse vollständig charakterisiert.

Diese Moleküle konnten in den nachfolgenden Adsorptionsversuchen durch die Anwendung der SA-Technik erfolgreich aus wässriger Lösung auf Titandioxid- und Aluminiumoxidsubstrate adsorbiert werden. Durch eine Variation der Alkylspacerlänge sowie der oberflächenaktiven Kopfgruppe konnte ein Einfluss auf die Schichtbildung, hinsichtlich der Ordnung und der Packungsdichte der Moleküle auf der Oberfläche erzielt werden.

Die resultierenden ultradünnen monomolekularen Schichten wurden mit verschiedenen analytischen Methoden unterschiedlicher Sensitivität untersucht. Es ist bekannt, dass Alkylphosphorsäure- und Alkylphosphonsäurederivate eine hohe Affinität zu metalloxidischen Oberflächen aufweisen. Die erfolgreichen Anbindungen der einzelnen Verbindungen an die Substratoberflächen konnten mit der Kontaktwinkelmessung, der Mikrotropfenanalyse, der Spektroskopischen Ellipsometrie, der XPS und das Schichtbildungsverhalten mit der SPR-Spektroskopie bestätigt werden. Die Ergebnisse zeigten homogene, geordnete Schichten der Verbindungen COOH-EG₃-C₁₇-PO₄H₂, COOH-EG₃-C₁₇-PO₃H₂, NH₂-EG₃-C₁₇-PO₃H₂ und COOH-C₁₇-PO₃H₂, aufgrund des langen Alkylspacers und der damit verbundenen starken Van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen den Molekülketten. Im Gegensatz dazu bildeten die kurzkettingen Verbindungen COOH-EG₃-C₁₁-PO₄H₂, COOH-EG₃-C₁₁-PO₃H₂ und NH₂-EG₃-C₁₁-PO₃H₂ ungeordnete, keine dicht gepackten SA-Schichten aus. Daraus ließ sich die Schlussfolgerung ziehen, dass die Länge der Alkylkette maßgeblich die Orientierung der Moleküle auf der Oberfläche beeinflusste. Mit winkelabhängigen XPS-Untersuchungen konnte die Elementzusammensetzung sowie die richtige Orientierung der adsorbierten Moleküle auf der Oberfläche festgestellt werden. Die Ergebnisse zeigten, dass sich die Phosphorsäure- bzw. Phosphonsäuregruppen im substratnahen Bereich und die Carboxyl- bzw. Aminogruppen im Anschluss an den Alkylspacer und der Tri(ethylenglykol)-einheit auf der Monoschicht befanden. Auf der

Grundlage dieser Resultate verlief die Anbindung der SA-Moleküle an die TiO_2 - und Al_2O_3 -Oberflächen erfolgreich.

Des Weiteren fanden Untersuchungen zur gezielten Anbindung der Alkylphosphonsäurederivate auf strukturierten Oberflächen statt. AFM-Messungen bestätigten die selektive Adsorption der Verbindungen an TiO_2 , die SiO_2 Bereiche wurden nicht modifiziert.

Eine Voraussetzung zur Durchführung von Proteinadsorptionstests ist die Stabilität der adsorbierten Monoschicht auf metalloxidischen Oberflächen gegenüber Pufferlösungen. Die SAMs aller Verbindungen wurden gegen PBS, Tris und HEPES2 Puffer getestet. Dabei zeigte die zuerst synthetisierte Verbindung $\text{COOH-EG}_3\text{-C}_{11}\text{-PO}_4\text{H}_2$ ein komplett instabiles Verhalten auf der Oberfläche und war somit für nachfolgende Proteinversuche nicht geeignet. Die Stabilität konnte durch die Einführung der Phosphonsäuregruppe als Haftgruppe verbessert werden. Ein wesentlich stabileres Verhalten zeigten die Verbindungen mit 17 Kohlenstoffeinheiten im Alkylspacer, vor allem die Substanz $\text{COOH-EG}_3\text{-C}_{17}\text{-PO}_3\text{H}_2$. Aus der Kinetikmessung der SPR-Spektroskopie sowie den Ellipsometrie- und XPS-Ergebnissen ging HEPES2 als das geeignetste Puffersystem für nachfolgende Proteinadsorptionsstudien hervor.

Bei den Versuchen zur Proteinadsorption wurde zwischen einer unspezifischen und einer spezifischen Anbindung von Proteinen an einer modifizierten Substratoberfläche unterschieden. Die Proteine BSA, Fibrinogen, Hämoglobin und Lysozym wurden aufgrund der unterschiedlichen Größe und des Isoelektrischen Punktes (IEP) für die unspezifischen Adsorptionstests verwendet. Ellipsometrie und SPR-spektroskopische Untersuchungen bewiesen ein unterschiedliches Adsorptionsverhalten der Proteine an den jeweiligen Monoschichten der C_{17} -Spezies. Die Proteine besaßen eine bedeutend geringere Affinität zu den Tri(ethylenglykol)-terminierten SAMs im Gegensatz zur hydrophoben Monoschicht der Referenzsubstanz OPA.

Eine proteinresistente Wirkung konnte durch die Erhöhung des Ethylenglykolanteils erzielt werden. Eine direkte Substitution der linearen, definierten Verbindung Hexa(ethylenglykol) an den Alkylspacer des SA-fähigen Moleküls war aufgrund der langen Alkylkette und der damit verbundenen Abnahme der Reaktivität nicht möglich. Deshalb erfolgte die Ankopplung dieser Verbindung über eine Oberflächenreaktion an die Monoschicht der Verbindung $\text{COOH-C}_{17}\text{-PO}_3\text{H}_2$. Die unspezifische Proteinanbindung konnte erheblich

zurückgedrängt werden. Eine komplette resistente Wirkung gegenüber unspezifischer Proteinadsorption wurde durch die Anbindung von hochverzweigtem Polyglycidol an die oben genannte Monoschicht erzielt. Die erfolgreiche Einführung von Hexa(ethylenglykol) und Polyglycidol konnte anhand der Kontaktwinkelmessung, der SPR-Spektroskopie sowie der XPS bestätigt werden.

Eine spezifische Immobilisierung konnte von Poly-L-Lysin an die aktivierte Monoschicht der carboxylterminierten Spezies sowie von Streptavidin an die biotinilierte SA-Schicht der aminoterminalisierten Verbindung erzielt werden. Die Anbindung verlief über Oberflächenreaktionen und der Erfolg konnte mittels SPR-Spektroskopie sowie XPS bestätigt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, neue maßgeschneiderte SA-Moleküle darzustellen. Durch eine gezielte Anbindung an TiO₂-Oberflächen und einer stabilen Ausbildung von SAMs konnten sowohl die unspezifische Proteinadsorption zurückgedrängt bzw. verhindert, als auch eine spezifische Anbindung von ausgewählten Proteinen realisiert werden.

7. Ausblick

Ein wichtiger Aspekt der Oberflächenmodifikation ist der Einsatz strukturierter Oberflächen zur lateralen Steuerung der Zelladhäsion. An derartigen Strukturen wird derzeit intensiv geforscht, da sie zur Untersuchung neuronaler Zellen und Netzwerke gebraucht werden und wichtige Werkzeuge im Bereich des „Tissue Engineering“ darstellen. Diese Arbeit stellt eine Vorarbeit hinsichtlich dieses Anwendungsbereiches dar, indem strukturierte Substrate in proteinwechselwirkende und proteinresistente Bereiche unterteilt werden und durch eine spezifische Anbindung zellwachstumsrelevanter Proteine eine Zellanbindung möglich ist. Erste Voruntersuchungen zur selektiven Anbindung von Tri(ethylenglykol)-terminierten Alkylphosphonsäurederivaten wurden auf strukturierten Substraten ($\text{TiO}_2/\text{SiO}_2$) durchgeführt, die eine Voraussetzung zur spezifischen Proteinanbindung darstellen. AFM-Untersuchungen zeigten eine Zunahme der Schichtdicke ausschließlich auf den TiO_2 -Flächen.

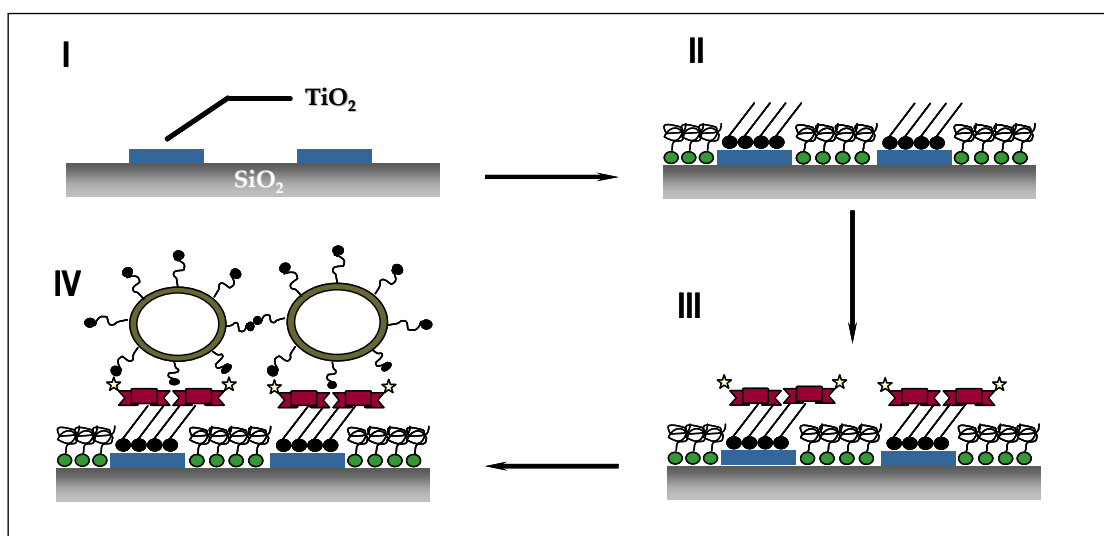


Abbildung 7-1: Schematische Darstellung der Mehrschritttechnologie

Abbildung 7-1 zeigt die Kombination zweier metalloxidischer Substrate, auf denen durch eine gezielte Oberflächenmodifikation zum Einen Proteine spezifisch angebunden und zum Anderen eine unspezifische Proteinadsorption vermieden werden soll. Die Modifikationsstrategie für diese strukturierte Oberflächen beinhaltet eine Mehrschrittprozedur, die zur Herstellung proteinresistenter und proteinwechselwirkender Bereiche auf der Oberfläche führt. In Abbildung 7-1 (I) ist die reine strukturierte Oberfläche, die aus einer SiO₂-Grundfläche und kleinen TiO₂-Strukturen im Mikrometerbereich besteht, dargestellt. Diese oxidischen Materialien ermöglichen die selektive Anbindung verschiedener maßgeschneiderter self-assembly-fähiger Moleküle (Abbildung 7-1 (II)), die einmal biokompatible Eigenschaften und einmal spezifische Proteine anbinden können. So binden auf den SiO₂ Flächen biokompatible Moleküle, wie PLL-PEG selektiv an. Auf den TiO₂-Strukturen adsorbieren ausschließlich Tri(ethylenglykol)-terminierte Alkylphosphonsäurederivate, die eine funktionelle terminale Gruppe (NH₂, COOH) besitzen, an die Proteine, wie Biotin spezifisch anbinden können (Abbildung 7-1 (III)). Abbildung 7-1 (IV) stellt die anschließende Ankopplung von Streptavidinmolekülen an die biotinilierten SAMs dar. Des Weiteren kann auch eine Anbindung von Fluoreszenzmarkern an die funktionalisierte Verbindung erfolgen. Als hilfreiche Charakterisierungsmethoden der modifizierten strukturierten Oberflächen würden sich die Fluoreszenzmikroskopie sowie die Imaging-Ellipsometrie anbieten.

Des Weiteren ist die Überprüfung der an der Oberfläche immobilisierten Proteine auf ihre Konformation ein wichtiger Aspekt. Die Fragestellung, ob sie unverändert oder denaturiert auf der Oberfläche vorliegen, ob sie voll funktionstüchtig oder in ihrer Funktion eingeschränkt sind, ist hinsichtlich einer späteren Anwendung im medizinischen als auch biochemischen Bereich wichtig zu klären. Werden zum Zellwachstum relevante, funktionstüchtige Proteine auf der Monoschicht adsorbiert, können Untersuchungen zur Zellanbindung und Zellwachstum durchgeführt und schließlich auch auf die strukturierten Substrate angewandt werden.

8. Literatur

- [1] Pertsin, A. J.; Grunze, M.; *Langmuir* **2000**, 16, 8829
- [2] Qian, X.; Metallo, S. J.; Choi, I. S.; Wu, H.; Liang, M. N.; Whitesides, G. M., *Anal. Chem.* **2002**, 74, 1805
- [3] Pale-Grosdemange, C.; Simon, E. S.; Prime, K. L.; Whitesides, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 12
- [4] Prime, K. L.; Whitesides, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 10714
- [5] Herrwerth, S.; Feng, C.; Fick, J.; Eck, W.; Himmelhaus, M.; Dahint, R.; Grunze, M. *Langmuir* **2003**, 19, 1880
- [6] Svedhem, S.; Hollander, C.-A.; Liedberg, B.; Svensson, S. *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 4494
- [7] Lahiri, J.; Isaacs, L.; Whitesides, G. M. *Anal. Chem.* **1999**, 71, 777
- [8] Chirakul, R.; Perez-Luna, O.; Owen, S.; Lopez, D.; *Langmuir* **2002**, 18 (11), 4324
- [9] Ostuni, E.; Chapman, R.; Holmlin, E.; Takayama, S.; Whitesides, G.; *Langmuir* **2001**, 17, 5605
- [10] Li, L.; Chen, S.; Zheng, J.; Ratner, B.; Jiang, S.; *J. Phys. Chem. B* **2005**, 109, 2934
- [11] Pérez-Luna, V.; O'Brien, M.; Oppermann, K.; Hampton, P.; Lopez, G.; Klumb, L.; Stayton, P.; *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 4669
- [12] Jiang, X.; Bruzewicz, D.; Thant, M.; Whitesides, G.; *Anal. Chem.* **2004**, 76, 6116
- [13] Mäge, I.; Dissertation TU Dresden; **1998**
- [14] Jähne, E.; Dissertation TU Dresden; **1999**
- [15] Oberoi, S.; Jaehne, E.; Adler, H.-J.; *Macromol. Symp.* **2004**, 217, 147
- [16] Gnauck, M.; Jaehne, E.; Blaettler, T.; Tosatti, S.; Textor, M.; Adler, H.-J. *Langmuir* **2007**, 23, 377
- [17] Hollemann, A.F.; Wiberg, N.; „*Hollemann-Wiberg Lehrbuch der anorganischen Chemie*“; Walter de Gruyter, Berlin **1995**, 101
- [18] Textor, M.; et al.; „*Properties and biological significance of natural oxide films on titanium and its alloys*“; D.M. Brunette; et al.; Editors **2001**; Springer-Verlag: Berlin & Heidelberg

- [19] Gutfleisch, M.; Dissertation Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen; **2004**
- [20] McCafferty, E.; Wightman, J. P.; Cromer, T. F.; *J. Electrochem. Soc.* **1999**; 146(8); 2849
- [21] Plagge A., Stratmann, M., Kowalik, T., Adler, H.-J., *Farbe und Lack* 11, **2000**, 48
- [22] Coster, D.; Blumenfeld, A. L.; Fripiat, J. J.; *J. Phys. Chem.* **1994**, 98, 6201
- [23] McCafferty, E.; Wightman, J. P.; *Surf. and Interf. Anal.* **1998**; 26; 549
- [24] Kasprzyk-Hordern, B.; *Adv. in Colloid and Interf. Sci.* **2004**; 110; 19
- [25] Ulman, A.; *Chem. Rev.* **1996**, 96,1533
- [26] Love, C.; Estroff, L.; Kriebel, J.; Nuzzo, R.; Whitesides, G.; *Chem. Rev.* **2005**, 105, 1103
- [27] Heinz, H.; Vaia, R.A.; Farmer, B.L.; *Langmuir* **2008**, 24 (8), 3727
- [28] Kuhn, H.; Ulman, A.; in *Thin Films Vol.20*, Academic Press, New York, **1995**
- [29] Nuzzo, R.G.; Allara, D.L.; *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 4481
- [30] Prime, K. L.; Whitesides, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 10714
- [31] Herrwerth, S.; Feng, C.; Fick, J.; Eck, W.; Himmelhaus, M.; Dahint, R.; Grunze, M. *Langmuir* **2003**, 19, 1880
- [32] Yang, L.; Galloway, S.; Yu, L. *Langmuir* **1999**, 15 (24), 8405
- [33] Chan, H.; Schweiss, R.; Werner, S.; Grunze, M. *Langmuir* **2003**, 19 (18), 7380
- [34] Maege, I.; Jaehne, E.; Henke, A.; Adler, H. J.; Bram, C.; Jung, C.; Stratmann, M. *Progress in Organic Coatings* **1998**, 34, 1
- [35] Jaehne, E.; Ferse, D.; Busch, G.; Adler, H. J.; Singh, A.; Varma, I. K. *Designed Monomers and Polymers* **2002**, 5 (4), 427
- [36] Yang, L.; Galloway, S.; Yu, L.; *Langmuir* **1999**, 15 (24), 8405
- [37] Jo, S.; Park, K.; *Biomaterials* **2000**, 21, 605
- [38] Pale-Grosdemange, C.; Simon, E.S.; Prime, K.L.; Whitesides, G.M.; *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 12
- [39] Qian, X.; Metallo, S.J.; Choi, I.S.; Wu, H.; Liang, M.N.; Whitesides, G.M.; *Anal. Chem.* **2002**, 74, 1805
- [40] Herrwerth, S.; Feng, C.; Fick, J.; Eck, W.; Himmelhaus, M.; Dahint, R.; Grunze, M.; *Langmuir* **2003**, 19,1880
- [41] Zhu, X.Y.; Jun, Y.; Bunker, B.C.; Guo, A.; Major, R.C.; *Langmuir* **2001**, 17, 7798
- [42] Stevens, M.J.; *Langmuir* **1999**, 15 (8), 8405
- [43] Helmy, R.; Wenslow, R.; Fadeev, A.; *J. of Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 7595
- [44] Wen, K.; Maoz, R.; Cohen, H.; Sagiv, J.; Gibaud, A.; Desert, A.; Ocko, B.; *J. of Am. Chem. Soc. Nano* **2008**, 2, 579
- [45] Jung, M.-H.; Lee, H.; *Langmuir* **2008**, 24 (17), 9825

- [46] Siegers, C.; Biesalski, M.; Haag, R.; *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 2831
- [47] Chelmowski, R.; Prekelt, A.; Grunwald, C.; Wöll, C.; *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 12295
- [48] Adden, N.; Gamble, L.; Castner, D.; Hoffmann, A.; Gross, G.; Menzel, H.; *Langmuir* **2006**, *22*, 8197
- [49] Spori, D. M.; Venkatamara, N.; Tosatti, S.; Durmaz, F.; Spencer, N.; Zürcher, S.; *Langmuir* **2007**, *23*, 8053
- [50] Tosatti, S.; Michel, R.; Textor, M.; Spencer, N.; *Langmuir* **2002**, *18*, 3537
- [51] Hofer, R.; Textor, M.; Spencer, N.D.; Hähner, G.; Feldmann, K.; Ruiz, L.; *Langmuir* **2000**, *16*, 3257
- [52] Mutin, H.; Guerrero G.; Vioux, A.; *J. Mater. Chem.* **2005**, *15*, 3761
- [53] Michel, R.; Lussi, J.; Csucs, G.; Reviakine, I.; Danuser, G.; Ketterer, B.; Hubbell, J.; Textor, M.; Spencer, N.; *Langmuir* **2002**, *18*, 3281
- [54] Huang, N.-P.; Michel, R.; Vörös, J.; Textor, M.; Hofer, R.; Rossi, A.; Elbert, D.; Hubbell, J.; Spencer, N.; *Langmuir* **2001**, *17*, 489
- [55] Lussi, J.; Falconnet, D.; Hubbell, J.; Textor, M.; Csucs, G.; *Biomaterials* **2006**, *27*, 2534
- [56] Blättler, T.; Pasche, S.; Textor, M.; Griesser, H.; *Langmuir* **2006**, *22*, 5760
- [57] Michel, R.; Pasche, S.; Textor, M.; Castner, D.; *Langmuir* **2005**, *21*, 12327
- [58] Lee, S.; Spencer, N. D.; *Langmuir* **2008**, *24* (17), 9479
- [59] Müller, B.; Förster, I.; *Corros. Sci.* **1996**, *38*, 1103
- [60] Adler, H.-J.; Jaehne, E.; Henke, A.; Yan, L.; Pich, A.; *Macromol. Symp.* **2002**, *187*, 53
- [61] Rajendran, S.; Apparao, B. V.; Palaniswamy, N.; Periasamy, V.; Karthikeyan, G.; *Corros. Sci.* **2001**, *43*, 1345
- [62] Randon, J.; Blanc, P.; Paterson, R.; *J. Membr. Sci.* **1995**, *98*, 119
- [63] Caro, J.; Noack, M.; Kölsch, P.; *Microporous and Mesoporous Materials* **1998**, *22*, 321
- [64] Villemin, D.; Jaffrés P.-A.; Nechab B.; Courivaud, F.; *Tetrahedron Letters* **1997**, *38*, 6581
- [65] Odobel, F.; Blart, E.; Lagrée, M.; Villieras, M.; Boujtita, H.; Murr, N.; Caramori, S.; Bignozzi, C. A.; *J. Mater. Chem.* **2003**, *13*, 502
- [66] Will, G.; Rao, J. S. N.; Fitzmaurice, D.; *J. Mater. Chem.* **1999**, *9*, 2297
- [67] Jaehne, E.; Ferse, D.; Busch, G.; Adler, H.-J.; Singh, A.; Varma, I.; *Designed Monomers and Polymers* **2002**, *5*, 427
- [68] Gawalt, E.; Avaltroni, M. J.; Danahy, M. P.; Silvermann, B. M.; Hanson, E. L.; Midwood, K. S.; Schwarzbauer, J. E.; Schwartz, J.; *Langmuir* **2002**, *19*, 200
- [69] Viornery, C.; Chevolot, Y.; Léonard, D.; Aronsson, B.-O.; Péchy, P.; Mathieu, H. J.; Descouts P.; Grätzel, M.; *Langmuir* **2002**, *18*, 2582

- [70] Josse, S.; Faucheux C.; Soueidan, A.; Grimandi, G.; Massiot, D.; Alonso, B.; Janvier, P.; Laib, S.; Gauthier, O.; Daculsi, G.; Guicheux, J.; Bujoli, B.; Bouler, J.-M.; *Adv. Mater.* **2004**, 16, 1423
- [71] Hofer, R.; Textor, M.; Spencer, N. D.; *Langmuir* **2001**, 17, 4014
- [72] Helmy, R.; Fadeev, A. Y.; *Langmuir* **2002**, 18, 8924
- [73] Marcinko, S.; Fadeev, A.; *Langmuir* **2004**, 20, 2270
- [74] Silvermann, B. M.; Wiegand, K. A.; Schwartz, J.; *Langmuir* **2005**, 21, 225
- [75] Luschinetz, R.; Oliveira, A.; Frenzel, J.; Joswig, J.-O.; Seifert, G.; Duarte, H. A.; *Surface Science* **2008**, 602, 1347
- [76] Zwahlen, M.; Tosatti, S.; Textor, M.; Haehner, G.; *Langmuir* **2002**, 18, 3957
- [77] Pawsey, S.; Yach, K.; Reven, L.; *Langmuir* **2002**, 18, 5205
- [78] Lukes, I.; Borbaruah, M.; Quin, L.D.; *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 1737
- [79] Hanson, E.; Schwartz, J.; Nickel, B.; Koch, N.; Danisman, M.; *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 16074
- [80] Mutin, P. H.; Lafond, V.; Popa, A.F.; Granier, M.; Markey, L.; Dereux, A.; *Chem. Mater.* **2004**, 16, 5670
- [81] Pertsin, A.; Grunze, M.; *Langmuir* **2000**, 16, 8829
- [82] Jeon, S. I.; Lee, J. H.; Andrade, J. D.; De Gennes, P. G.; *J. Coll. Interface Sci.* **1991**, 142, 149
- [83] Latour, R. A.; *J. Biomed. Mater. Res. A* **2006**; 78A, 843
- [84] Harder, P.; Grunze, M.; Dahint, R.; Whitesides, G. M.; Laibinis, P. E.; *J. Phys. Chem. B.* **1998**, 102, 426
- [85] Uchida, K.; Otsuka, H.; Kaneko, M.; Kataoka, K.; Nagasaki, Y.; *Anal. Chem.* **2005**, 77, 1075
- [86] Wahlgren, M.; Arnebrant, T.; *Trends in Biotechnology* **1991**; 9; 201
- [87] Tengvall, P.; Askendal, A.; Lundström, I.; *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2001**; 20; 51
- [88] Mrksich, M.; Whitesides, G. M.; *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1996**, 25, 55
- [89] Jackler, G.; Steitz, R.; Czeslik, C.; *Langmuir* **2002**, 18, 6565
- [90] Norde, W.; *Plenum Press: New York* **1980**; 801
- [91] Maege, I.; Jaehne, E.; Henke, A.; Adler, H. J.; Bram, C.; Jung, C.; Stratmann, M. *Progress in Organic Coatings* **1998**, 34, 1
- [92] Jaehne, E.; Ferse, D.; Busch, G.; Adler, H. J.; Singh, A.; Varma, I. K. *Designed Monomers and Polymers* **2002**, 5 (4), 427
- [93] Oberoi, S.; Jaehne, E.; Adler, H. J. *Macromol. Symp.* **2004**, 217, 147

- [94] Hector, L., Opalka, S., Nitowski, G., Wiesermann, L., Siegel, D., Yu, H., Adams, J., *Surf. Sci.* **2001**, 494, 1
- [95] Lee, J., Kim, Y., Chi, Y., Yun, W., Choi, I. *J. Phys. Chemistry B* **2004**, 108, 7665
- [96] Valiokas, R.; Svedhem, S.; Svensson, S.; Liedberg, B. *J. Phys. Chem. B* **2000**, 104 (32), 7565
- [97] Valiokas, R.; Svedhem, S.; Svensson, S.; Liedberg, B. *Langmuir* **1999**, 15 (10), 3390
- [98] Valiokas, R.; Svedhem, S.; Svensson, S.; Östblom, M.; Liedberg, B. *J. Phys. Chem. B* **2001**, 105, 5459
- [99] Wang, R. L. C.; Kreuzer, H. J.; Grunze, M. *J. Phys. Chem. B* **1997**, 101, 9767
- [100] Nguyen, T. *Tetrahedron* **2006**, 62, 647
- [101] Organikum, 20. Auflage, S.283
- [102] Brückner, R.; „Reaktionsmechanismen: Organische Reaktionen, Stereochemie, moderne Synthesemethoden“; Spektrum Akademischer Verlag; 1. Auflage; **1996**
- [103] Effenberger, E.; Heid, S.; *Synthesis* **1995**, 1126
- [104] Tokumitsu, S.; Liebich, A.; Herrwerth, S.; Eck, W.; Himmelhaus, M.; Grunze, M.; *Langmuir* **2002**, 18, 8862
- [105] Chirakul, R.; Perez-Luna, O.; Owen, S.; Lopez, D.; *Langmuir* **2002**, 18, 4324
- [106] Knights, E. F.; Brown, C.; *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, 90 (19), 5283
- [107] Zhang, J.; Kirkham, J.; Robinson, C.; Wallwork, M.L.; *Anal.Chem.* **2000**, 72, 1973
- [108] Arbuzov, B.A.; *Pure Appl. Chem.* **1964**, 9, 307
- [109] Oberoi, S.; Dissertation TU Dresden, **2005**
- [110] Kim, M.; Seo, K.; Khang, G.; Lee, H.; *Bioconjugate Chem.* **2005**, 16, 245
- [111] Ziegler, A.; Diplomarbeit TU Dresden, **2007**
- [112] Chapman, R.; Ostuni, E.; Yan, L.; Whitesides, G.; *Langmuir* **2000**, 16, 6927
- [113] Michel, R.; Dissertation ETH Zürich, **2002**
- [114] Köhler, M.; Fritzsche, W.; „Nanotechnology“; Wiley-VCH, Weinheim **2007**, 2. Auflage
- [115] biplex: bipweb-Lexikon der Moleküle
- [116] Müschenborn, B.; Dissertation Medizinische Fakultät der Heinrich Heine Universität Düsseldorf, **2004**
- [117] <http://www.sciencedaily.com>
- [118] DocCheck®Flexikon – Das Medizinlexikon; <http://flexikon.doccheck.com>
- [119] Datenblätter Naturstoffe, Biotin; www.scientificjournals.com
- [120] Katz, B. A.; *J. Mol. Biol.* **1997**; 274 (5); 776
- [121] Tosatti, S.; Dissertation ETH Zürich, **2003**

- [122] Kwok, D. Y.; Neumann, A. W.; *Adv. Colloid and Interf. Sci.* **1999**, *81*, 167
- [123] Stekolnikov, A. A.; Furthmüller, J.; Bechstedt, F.; *Phys. Rev. B* **2002**, *65*, 115318
- [124] Häfer, M.; *Krüß Handbuch: Kontaktwinkelmessung und Methoden zur Bestimmung der freien Grenzflächenenergie von Festkörpern* **1994**, Krüss GmbH
- [125] Satomi, T.; Nagasaki, Y.; Kobayashi, H.; Otsuka, H.; Kataoka, K.; *Langmuir* **2007**, *23*, 6698
- [126] Sigal, G. B.; Mrksich, M.; Whitesides, G.; *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 3464
- [127] Tsai, P.-S.; Yang, Y.-M.; Lee, Y.-L.; *Langmuir* **2006**, *22*, 5660
- [128] Hofer, R.; Textor, M.; Spencer, N. D.; *Langmuir* **2001**, *17*, 4123
- [129] Busch, G.; Dissertation TU Dresden, **2005**
- [130] Junghans, T.; Diplomarbeit TU Dresden, **2007**
- [131] Hofer, R.; Textor, M.; Spencer, N. D.; *Langmuir* **2001**, *17*, 4014
- [132] Aust, E. F.; Ito, S.; Sawodny, M.; Knoll, W.; *Trends Polym. Sci.* **1994**, *2*, 313
- [133] Anamelechi, C. C.; Clermont, E. E.; Brown, M. A.; Truskey, G. A.; Reichert, W. M.; *Langmuir* **2007**, *23* (25), 12583
- [134] Liedberg, B.; Nylander, C.; Lundström, I.; *Biosensors & Bioelectronics* **1995**, *10*, 1218
- [135] Lahiri, J.; Isaacs, L.; Whitesides, G.M.; *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 777
- [136] Ajikumar, P. K.; Ng, J. K.; Tang, Y. C.; Lee, J. Y.; Stephanopoulos, G.; Too, H.-P.; *Langmuir* **2007**, *23*, 5670
- [137] Perez-Luna, V. H.; O'Brien, M. J.; Oppermann, K. A.; Hampton, P. D.; Lopez, G. P.; Klumb, L. A.; Stayton, P. S.; *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6469
- [138] Azzam, R. M. A.; Bashara, N. M.; „*Ellipsometry and polarized light*“, North-Holland Physics Publishing a division of Elsevier Science Publisher B.V., Amsterdam, Niederlande, **1987**
- [139] Arbeitskreis Ellipsometrie – Paul Drude e.V.; <http://www.bam.de>
- [140] DeFeijter, J. A.; Benjamins, J.; Veer, F. A.; *Biopolymers* **1978**, *17*, 1759
- [141] Zoulalian, V.; Monge, S.; Zürcher, S.; Textor, M.; Robin, J. J.; Tosatti, S.; *J. of Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 25603
- [142] Ducharme, D.; Tessier, A.; Russev, S. C.; *Langmuir* **2001**, *17*, 7529
- [143] Palik, E.; „*Handbook of optical constants of solids*“, New York Academic Press: Orlando, FL, **1985**
- [144] Hofer, R.; Dissertation ETH Zürich, **2000**
- [145] Cai, X.; Arbeitsbericht „*Synthesis of Phosphonic Acid Derivates*“; TU Dresden; **2001**
- [146] Roberts, C.; Chen, C.S.; Mrksich, M.; Whitesides, G.M.; *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6548

- [147] Yadavet, J.S.; Reddy, B.V.S.; Rao, K.S.; Harikishan, K.; *Synlett* **2002**, 5, 826-828
- [148] Mellott, J. M.; Schwartz, D. K.; *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 9369
- [149] Porter, M.D.; Bright, T.B.; Allara, D.L.; *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 3559
- [150] Calculations were performed with Gaussian 03, Revision D.01, Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery, Jr., J. A.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; and Pople, J. A.; Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2004. Becke, A.D., *J. Chem. Phys.* **1993**, 98, 5648-5652. Lee, C.; Yang, W.; Parr, R.G., *Phys. Rev. B.*, **1988**, 37, 785-789. Vosko, S.H.; Wilk, L.; Nusair, M.; *Can. J. Phys.* **1980**, 58, 1200-1211. Stephens, P.J.; Devlin F.J.; Chabalowski, C.F.; Frisch, M.J., *J. Phys. Chem.* **1994**, 98, 11623-11627
- [151] Ulman, A.; „An introduction to ultrathin organic films: From Langmuir-Blodgett to Self-Assembly“, Academic Press Inc., San Diego, **1991**
- [152] Simon, F.; SFB Teilbericht; IPF Dresden; **1999-2001**
- [153] Harder, P.; Grunze, M.; Dahint, R.; Whitesides, G. M.; Laibinis, P. E.; *J. Phys. Chem. B.* **1998**, 102, 426
- [154] Zolk, M.; Eisert, F.; Pipper, J.; Herrwerth, S.; Eck, W.; Buck, M.; Grunze, M.; *Langmuir* **2000**, 16, 5849
- [155] Nelles, G.; Weisser, M.; Back, R.; Wohlfahrt, P.; Wenz, G.; Mittler-Neher, S.; *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 5039
- [156] Azzam, R. M. A.; Bashara, N.M.; „*Ellipsometry and polarized light*“; Elsevier Amsterdam **1987**
- [157] Hollas, J. M.; „*Moderne Methoden in der Spektroskopie*“; Vieweg, Braunschweig/Wiesbaden, **1995**
- [158] Shirley, D. A.; *Physical Review B.* **1972**, 5(12), 4709
- [159] Scofield, J. H. *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.* **1976**, 8, 129

Die vorliegende Arbeit wurde unter der wissenschaftlichen Betreuung von Prof. Dr. rer. nat. habil. Hans-Jürgen P. Adler und Dr. rer. nat. Evelin Jähne in der Zeit von Oktober 2004 bis Oktober 2008 an der Professur für Makromolekulare Chemie und Textilchemie der Technischen Universität Dresden angefertigt.

Versicherung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Mandy Gnauck
